

Aus der Klinik für Allgemeine, Unfall-, Hand- und Plastische Chirurgie,  
der Ludwig-Maximilians-Universität München,  
Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Böcker

---

**Dynamik des STAT/SOCS-Regulationsmechanismus in der frühen  
posttraumatischen Phase nach schwerem Polytrauma**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Rainer Michael Matz  
aus München

2015

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Karl-Georg Kanz

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Sandra Hake  
Prof. Dr. Eugen Faist  
Prof. Dr. Hans- Georg Dietz

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. Viktoria Bogner

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 22.01.2015

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>10</b>
1.1	Pathophysiologie der posttraumatischen Entzündungsreaktion.....	11
1.2	Interleukin-6 .....	14
1.3	Interleukin-10 .....	15
1.4	Zelluläre Signalübertragung .....	16
1.4.1	JAK/STAT-Signaltransduktionsweg .....	16
1.4.1.1	Signal Transducers and Activators of Transkription (STAT) .....	19
1.4.1.2	Supressors of Cytokine Signalling (SOCS) .....	20
<b>2</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>Patienten und Methoden.....</b>	<b>25</b>
3.1	Untersuchungskollektiv.....	25
3.2	Kontrollgruppe .....	25
3.3	Score-Systeme .....	26
3.3.1	New Injury Severity Score .....	26
3.4	Materialgewinnung.....	26
3.5	Zellisolierung .....	27
3.5.1	Erythrozytenlyse.....	27
3.5.2	Zellseparation mittels magnetischer Zellsortierung (MACS) .....	27

3.6	RNA-Isolierung .....	29
3.7	Konzentrationsbestimmung der RNA .....	30
3.8	cDNA Synthese .....	30
3.9	Quantitative RT-PCR.....	31
3.10	Qualitätskontrolle .....	33
3.10.1	Schmelzkurven-Analyse.....	33
3.10.2	Agarose-Gel Elektrophorese .....	34
3.11	Statistische Auswertung .....	35
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>36</b>
4.1	Klinisch-demographische Daten .....	36
4.2	Spezifitätskontrollen.....	39
4.2.1	Gel-Elektrophorese.....	42
4.3	IL-6-mRNA-Expression in Monozyten und Granulozyten polytraumatisierter Patienten .....	43
4.4	IL-10-mRNA-Expression in Monozyten und Granulozyten polytraumatisierter Patienten .....	43
4.4.1	IL-10-mRNA-Expression in Monozyten .....	43
4.4.1.1	IL-10-mRNA-Expression in Monozyten: Kontrollen .....	43
4.4.1.2	IL-10-mRNA-Expression in Monozyten: Gesamtkollektiv .....	43
4.4.1.3	IL-10-mRNA-Expression in Monozyten: Einteilung nach der	

Verletzungsschwere .....	45
4.4.1.4 IL-10-mRNA-Expression in Monozyten: Einteilung nach dem Outcome...	47
4.4.2 IL-10-mRNA-Expression in Granulozyten .....	49
4.4.2.1 IL-10-mRNA-Expression in Granulozyten: Kontrollen .....	49
4.4.2.2 IL-10-mRNA-Expression in Granulozyten: Gesamtkollektiv .....	49
4.4.2.3 IL-10-mRNA-Expression in Granulozyten: Einteilung nach der Verletzungsschwere .....	51
4.4.2.4 IL-10-mRNA-Expression in Granulozyten: Einteilung nach dem Outcome	53
4.5 STAT3-mRNA-Expression in Monozyten und Granulozyten polytraumatisierter Patienten .....	55
4.5.1 STAT3-mRNA-Expression in Monozyten .....	55
4.5.1.1 STAT3-mRNA-Expression in Monozyten: Kontrollen .....	55
4.5.1.2 STAT3-mRNA-Expression in Monozyten polytraumatisierter Patienten: Gesamtkollektiv .....	55
4.5.1.3 STAT3-mRNA-Expression in Monozyten polytraumatisierter Patienten: Einteilung nach der Verletzungsschwere .....	57
4.5.1.4 STAT3-mRNA-Expression in Monozyten polytraumatisierter Patienten: Einteilung nach dem Outcome .....	58
4.5.2 STAT3-mRNA-Expression in Granulozyten .....	59
4.5.2.1 STAT3-mRNA-Expression in Granulozyten: Kontrollen .....	59
4.5.2.2 STAT3-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten:	

Gesamtkollektiv .....	59
4.5.2.3 STAT3-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten: Einteilung nach der Verletzungsschwere.....	61
4.5.2.4 STAT3-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten: Einteilung nach dem Outcome .....	63
4.6 SOCS1-mRNA-Expression in Monozyten und Granulozyten polytraumatisierter Patienten .....	65
4.6.1 SOCS1-mRNA-Expression in Monozyten.....	65
4.6.1.1 SOCS1-mRNA-Expression in Monozyten: Kontrollen .....	65
4.6.1.2 SOCS1-mRNA-Expression in Monozyten polytraumatisierter Patienten: Gesamtkollektiv.....	65
4.6.1.3 SOCS1-mRNA-Expression in Monozyten polytraumatisierter Patienten: Einteilung nach der Verletzungsschwere.....	67
4.6.1.4 SOCS1-mRNA-Expression in Monozyten polytraumatisierter Patienten: Einteilung nach dem Outcome .....	69
4.6.2 SOCS1-mRNA-Expression in Granulozyten .....	71
4.6.2.1 SOCS1-mRNA-Expression in Granulozyten: Kontrollen.....	71
4.6.2.2 SOCS1-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten: Gesamtkollektiv.....	71
4.6.2.3 SOCS1-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten: Einteilung nach der Verletzungsschwere.....	73
4.6.2.4 SOCS1-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten:	

Einteilung nach dem Outcome .....	75
4.7    SOCS3-mRNA-Expression in Monozyten und Granulozyten polytraumatisierter Patienten .....	77
4.7.1    SOCS3-mRNA-Expression in Monozyten.....	77
4.7.1.1    SOCS3-mRNA-Expression in Monozyten: Kontrollen .....	77
4.7.1.2    SOCS3-mRNA-Expression in Monozyten polytraumatisierter Patienten: Gesamtkollektiv.....	77
4.7.1.3    SOCS3-mRNA-Expression in Monozyten polytraumatisierter Patienten: Einteilung nach der Verletzungsschwere.....	79
4.7.1.4    SOCS3-mRNA-Expression in Monozyten polytraumatisierter Patienten: Einteilung nach dem Outcome .....	81
4.7.2    SOCS3-mRNA-Expression in Granulozyten .....	83
4.7.2.1    SOCS3-mRNA-Expression in Granulozyten: Kontrollen.....	83
4.7.2.2    SOCS3-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten: Gesamtkollektiv.....	83
4.7.2.3    SOCS3-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten: Einteilung nach der Verletzungsschwere.....	85
4.7.2.4    SOCS3-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten: Einteilung nach dem Outcome .....	87
<b>5    Diskussion.....</b>	<b>89</b>
5.1    Diskussion der Methodik .....	90

5.1.1	Studiendesign .....	90
5.1.2	Patientenkollektiv .....	91
5.1.3	Positivkontrolle .....	92
5.1.4	Zellisolation.....	93
5.2	Monozyten.....	94
5.3	Granulozyten .....	95
5.4	Interleukin-10 .....	95
5.4.1	Interleukin-10-mRNA-Expression in Monozyten polytraumatisierter Patienten .....	97
5.4.2	Interleukin-10-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten.. .....	98
5.5	STAT3.....	99
5.5.1	STAT3-mRNA-Expression in Monozyten polytraumatisierter Patienten .....	100
5.5.2	STAT3-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten ..	101
5.6	SOCS1.....	102
5.6.1	SOCS1-mRNA-Expression in Monozyten polytraumatisierter Patienten .....	102
5.6.2	SOCS1-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten..	103
5.7	SOCS3.....	104
5.7.1	SOCS3-mRNA-Expression in Monozyten polytraumatisierter Patienten .....	104
5.7.2	SOCS3-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten..	105



5.8	Limitationen .....	107
5.9	Schlussfolgerung .....	109
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>111</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>118</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>131</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>133</b>

# **1 Einleitung**

In den letzten Jahren ist die Zahl der Verkehrstoten trotz eines stetig wachsenden Verkehrsaufkommens kontinuierlich gesunken (1). Der Grund hierfür liegt zum einen an einer immer besseren Sicherheitstechnik in den verwendeten Fahrzeugen und zum anderen an Fortschritten sowohl in der präklinischen als auch in der klinischen Behandlung schwerstverletzter Unfallopfer (2).

Trotz dieser Entwicklung waren im Jahr 2010 in Deutschland Verletzungen nach Unfällen die häufigste Todesursache von Menschen im Alter zwischen 18 und 24 Jahren. Alleine im deutschen Straßenverkehr verunglücken jährlich etwa 375.000 Menschen, von denen immer noch annähernd 3700 an ihren Verletzungen versterben (1).

Wird bei einem Unfall mehr als eine Körperregion verletzt, wobei wenigstens eine der Verletzungen oder die Kombination mehrerer Verletzungen vital bedrohlich ist, so spricht man von einem Polytrauma (3;3). Ein Teil dieser Polytraumapatienten verstirbt bereits innerhalb der ersten 48 Stunden nach Trauma aufgrund eines schweren Schädelhirntraumas oder durch einen hohen Blutverlust, verursacht durch stumpfe oder penetrierende Verletzungen (4;5).

Wird das erlittene Trauma primär überlebt, verstirbt ein Teil der Patienten an einem sekundären Hirnschaden oder einem Multiorganversagen. Ursächlich für ein solches Multiorganversagen ist die Dysregulation der posttraumatischen Entzündungsreaktion (6). Ein solches Multiorganversagen, das etwa 15% der Polytraumapatienten entwickeln, ist eine der schwerwiegendsten Komplikationen und die häufigste späte Todesursache dieser Patienten (7).

## 1.1 Pathophysiologie der posttraumatischen Entzündungsreaktion

Ein Teil der Unfallopfer, die eine schwere Verletzung initial überleben, entwickeln im weiteren Verlauf schnell eine überschießende systemische Entzündungsreaktion, das *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS). Klinische Parameter hierfür sind eine Tachycardie von  $>90/\text{min}$ , eine Hyperventilation von  $>20/\text{min}$  bzw. eine Hypoventilation von  $\text{PaCO}_2 < 32 \text{ mmHg}$ , eine Körpertemperatur von  $>38$  oder  $<36^\circ\text{C}$  sowie eine Leukozytenzahl von  $>12.000/\text{mm}^3$  oder  $<4.000/\text{mm}^3$  oder  $>10\%$  unreife Neutrophile im Differentialblutbild. Definitionsgemäß müssen bei einem SIRS mindestens zwei dieser Parameter zutreffen (8). Ziel dieser Reaktion ist die Aktivierung der Haemostase, die Abwehr eingedrungener Mikroorganismen sowie die Initiierung von Gewebsreparaturmechanismen und Wundheilung (9). Eine Dysregulation dieser Entzündungsreaktion führt durch Endothelschädigung, Anhäufung von Leukozyten, disseminierter intravasaler Gerinnung und Störung der Mikrozirkulation zu Apoptose und Parenchymzellnekrose auch an primär nicht durch das Trauma verletzten Organen. Die Folge ist ein *Multiple Organ Dysfunction Syndrome* (MODS) und schließlich ein Multiorganversagen, *Multiple Organ Failure* (MOF, early MOF), das mit einer hohen Mortalität einhergeht (10;11;12;13). Die Mehrheit der Patienten überlebt das SIRS und entwickelt eine kompensatorische antiinflammatorische Reaktion, das *Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome* (CARS). Das CARS ist eine dem SIRS entgegengerichtete Reaktion mit verstärkter Wirkung antiinflammatorischer Prozesse mit dem Ziel, das SIRS und dessen Folgen einzudämmen. Es kommt zu einer verminderten Freisetzung inflammatorischer Mediatoren und zu einer verminderten Reaktion des Immunsystems auf Endotoxine. Der Mechanismus dieser Endotoxintoleranz ist sehr komplex und noch nicht vollständig verstanden (14;15). Diese supprimierte Funktion des Immunsystems geht mit einer erhöhten Infekt- und Sepsisanfälligkeit einher und kann ebenfalls über ein MODS in ein Multiorganversagen (late MOF) münden (16). Bei

Polytraumapatienten ist das Auftreten des SIRS und des CARS zeitlich nicht eindeutig zu trennen. Ein zeitgleiches Auftreten pro- und antiinflammatorischer Prozesse ist häufig und wird als *Mixed Antiinflammatory Response Syndrom* (MARS) bezeichnet (17;6). Eine graphische Übersicht gibt **Abb. 1**.

**Abb. 1:**

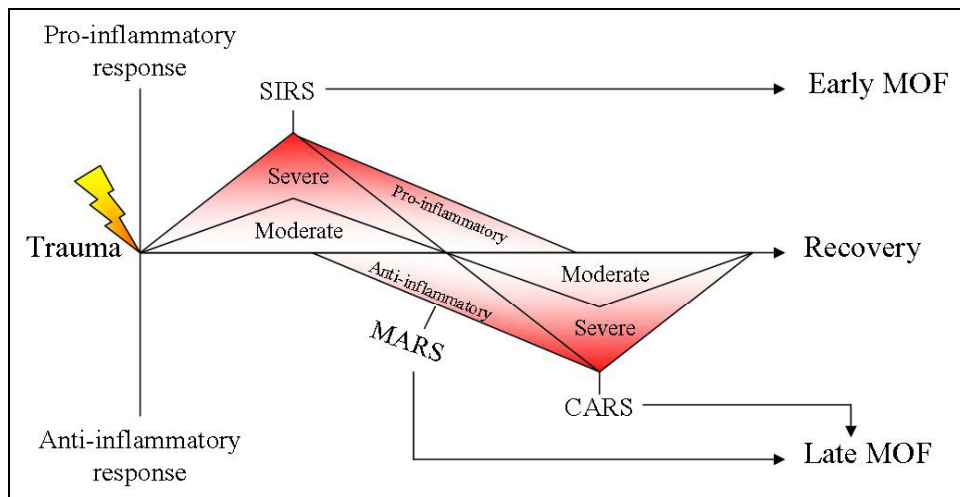


Abb. 1 zeigt die Entwicklung der posttraumatischen Entzündungsreaktion nach Hietbrink et al. Im Anschluss an ein Trauma kommt es zu einer proinflammatorischen Reaktion, dem Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). Ein Überschießen dieser Reaktion kann zu einem Multiorganversagen (early MOF) führen. Im Anschluss an die proinflammatorische Antwort kommt es zu einer antiinflammatorischen Gegenreaktion, dem Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome (CARS). Ein Überschießen dieser Reaktion kann ebenfalls in ein Multiorganversagen führen (late MOF). Ein zeitgleiches Auftreten dieser pro- und antiinflammatorischen Prozesse wird als Mixed Antiinflammatory Response Syndrome (MARS) bezeichnet (6).

Die durch ein Trauma verursachten Organverletzungen, Gewebsschäden oder Knochenbrüche verursachen neben den lokalen Schädigungen wie Kontusionen, Lacerationen, Hypoxie und Hypotension eine posttraumatische Entzündungsreaktion, deren Ziel eine Bewahrung der immunologischen Integrität und die Stimulation von Reparationsmechanismen ist (18). Die Intensität dieser Reaktion ist vom Ausmaß der Verletzungen, der Höhe des Blutverlustes, von genetischen Faktoren und dem Geschlecht abhängig (19;20;21;6;22;23;24). Humorale

(Komplement- und Gerinnungssystem) und zelluläre (Endothelzellen, neutrophile Granulozyten, Makrophagen, Lymphozyten) Systeme werden aktiviert mit folgender Expression, Synthese und Freisetzung lokaler und systemischer Mediatoren.

Traumatische Gewebsschädigungen und Hypoperfusion führen zur Aktivierung von Granulozyten, Monozyten und Makrophagen. Granulozyten bilden mit 50-60% den größten Anteil aller im Blut zirkulierender Leukozyten und spielen eine wichtige Rolle in der posttraumatischen Entzündungsreaktion. Sie bilden die erste immunologische Abwehr gegen Mikroorganismen und migrieren zur Wundheilung und zur Abwehr von Mikroorganismen in das verletzte Gewebe. Neben dem lokalen Nutzen der aktivierten Granulozyten führt eine systemische Aktivierung zur Migration in Organe, die nicht primär durch das Trauma verletzt wurden. In diesen Organen sind sie der Auslöser für sekundäre Organ- und Gewebsschäden, die zur Entwicklung eines MOF führen können (25;26;27).

Monozyten/Makrophagen werden im Anschluss an die initiale Traumaantwort rekrutiert. Sie sind am Wundheilungsmechanismus durch Debridement und Sekretion biologisch aktiver Substanzen wie Wachstumsfaktoren beteiligt. Die meisten dieser Makrophagen entwickeln sich in den verletzten Geweben aus Blutmonozyten. Die Rekrutierung dieser Monozyten erfolgt durch chemotaktische Signale des verletzten Gewebes, durch aktivierte Immunzellen und durch die Anwesenheit von Bakterien. Makrophagen phagozytieren Mikroorganismen und modulieren im Anschluss das erlernte Immunsystem durch Antigenpräsentation. Auch nach einem Trauma bilden die Makrophagen das Bindeglied zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem. Eine verminderte Expression der antigenpräsentierenden Rezeptoren und damit einer verminderten Antigenpräsentation der Monozyten ist mit einer höheren Inzidenz septischer Komplikationen nach schwerem Trauma verbunden. Über diese verminderte Antigenpräsentation sind die Monozyten entscheidend an der Entwicklung eines posttraumatischen CARS beteiligt (28;6;29).

Zytokine spielen als Botenstoffe des interzellulären Zellkontaktes eine wichtige Rolle. Nach einem Trauma kommt es zur vermehrten Freisetzung von Zytokinen aus Zellen des geschädigten Gewebes und aktivierten Immunzellen. Dieses vermehrte Auftreten der Zytokine ist ein Zeichen einer verstärkten zellulären Transkription und Translation. Zytokine binden an spezifische zelluläre Rezeptoren und bewirken dadurch die Aktivierung intrazellulärer Signalübertragungswege, welche die Gentranskription regulieren. Über diesen Mechanismus beeinflussen Zytokine die Immunzellaktivität und steuern die Produktion und Aktivität anderer Zytokine (6;30). Die Überproduktion und Regulation von Zytokinen und deren Wirkung auf Zellen des angeborenen Immunsystems spielen eine wichtige Rolle bei der Auslösung und Regulation der posttraumatischen Entzündungsreaktion (31).

## **1.2 Interleukin-6**

Interleukin-6 (IL-6) ist ein seit langem bekanntes und multifunktionales Zytokin, das eine modulatorische Wirkung in posttraumatischen, infektiösen und malignen Prozessen hat. Es kann von nahezu jedem Gewebe und Zelltyp gebildet werden, beeinflusst die Proliferation, Differenzierung und Reifung von Vorläuferzellen der Hämatopoese und anderen Zelllinien, die Größenregulation von Karzinomzelllinien und kontrolliert die metabolische zelluläre Aktivität (32).

Expressionsfördernd auf IL-6 wirken unter anderem bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), Interleukin-1 (IL-1), Tumor-Necrose-Faktor (TNF) und Virusbestandteile. Eine verminderte Expression wird durch die Wirkung von Interleukin-10, Glucocortikoiden und Prostaglandin E hervorgerufen (32).

Untersuchungen der letzten Dekaden zeigten eine Modulation von IL-6 nach Gewebsschäden und Trauma. Es konnte eine Erhöhung der IL-6 Konzentration im Blut nach Operationen, Verbrennungen und Verletzungen gezeigt werden, welche der Erhöhung der Akut-Phase-

Proteine vorausgeht. Die Höhe der IL-6 Blutkonzentration korreliert mit der Verletzungsschwere, mit der Entwicklung von posttraumatischen Komplikationen und der posttraumatischen Mortalität (33;34). Bei polytraumatisierten Patienten werden erhöhte IL-6 Serumspiegel bereits früh nach dem Trauma gemessen und korrelieren bereits beim Eintreffen in das Krankenhaus mit der Verletzungsschwere (35).

IL-6 hat auch eine wichtige immunmodulatorische Wirkung. Es wird eine Aktivierung der Synthese von Akut-Phase-Proteinen und eine stimulierende Wirkung auf Monozyten und Granulozyten beschrieben (36;37;38;39). IL-6 wirkt proliferationsfördernd auf Vorläuferzellen der polymorphkernigen Granulozyten; es kommt zu einem mit IL-6 assoziierten massiven Anstieg dieser Zellen im Knochenmark und Blut (40). Zudem verzögert IL-6 die Apoptose von polymorphkernigen Granulozyten (41). Im Tiermodell konnte durch IL-6-Injektion jedoch keine systemische Entzündung ausgelöst werden (42).

### **1.3 Interleukin-10**

Interleukin-10 (IL-10) ist ein hochpotentes antiinflammatorisches Zytokin, das von T-Zellen, B-Zellen, Monozyten und Makrophagen sezerniert wird. Es hat eine inhibierende Wirkung auf die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und Interleukin-8 aus Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen und natürlichen Killerzellen (43). Des Weiteren bewirkt es eine systemische Deaktivierung der proinflammatorischen Mediatoren TNF- $\alpha$  und IL-1 (43;44). In vitro Untersuchungen zeigen einen hemmenden Effekt von IL-10 auf die messenger RNA (mRNA) Expression und Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren in Granulozyten drei bis sechs Stunden nach Lipopolysaccharid (LPS)-Stimulation (45). Die Beteiligung von IL-10 am posttraumatischen Entzündungsprozess konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden. Die systemische IL-10-Konzentration steigt nach Polytrauma, bei Sepsis, Verbrennungen, Pankreatitis und ARDS an (46;47;48;49;50;51) und korreliert mit der Verletzungsschwere und dem Überleben (52). Die IL-10 Konzentration ist auch mit der

Entwicklung einer schweren Infektion und einer verlängerten Liegezeit auf Intensivstationen assoziiert (53). Ein Ausbleiben der antiinflammatorischen Wirkung von IL-10 zeigt im Tiermodell ebenfalls Auswirkungen: Im Verbrennungsmodell kommt es im Rahmen einer Sepsis durch frühe Neutralisation von IL-10 durch Antikörper zu einer häufigeren Letalität (49). Diese Wirkungen weisen auf einen wichtigen antiinflammatorischen Einfluss von IL-10 bei der Entstehung der posttraumatischen Entzündungsreaktion hin.

## **1.4 Zelluläre Signalübertragung**

### **1.4.1 JAK/STAT-Signaltransduktionsweg**

Interleukine wirken über eine Bindung an spezifische Oberflächenrezeptoren der Effektorzellen. Ein wichtiger Mechanismus dieser Signalübertragung ist der *Januskinase (JAK) / Signal Transducer and Activator of Transkription (STAT)* -Signaltransduktionsweg. Bei diesem Weg der Signalübertragung binden die Zytokine als Liganden an Rezeptoren der Zelloberfläche und initiieren dadurch eine Änderung der Genexpression im Zellkern (54).

Nach der Bindung des Zytokins an den Rezeptor kommt es zu einer schnellen Tyrosin-Phosphorylierung des intrazellulären Rezeptoranteils durch die JAK. An dieses phosphorylierte Tyrosin bindet nun das STAT-Protein, welches anschließend selbst phosphoryliert wird. Die phosphorylierten STAT-Proteine lösen sich wieder vom Rezeptor und bilden Dimere. In dieser dimerisierten Form gelangen die STAT-Proteine in den Zellkern, binden spezifisch an die DNA und initiieren so die Transkription von verschiedenen Genen (siehe Abb. 2 a und b) (55;56;57).

Zu den verschiedenen Effektorgenen der STAT-Proteine gehören auch Gene, die für die *Suppressor Of Cytokine Signalling (SOCS)* Proteine kodieren. Diese Proteine wirken unter anderem als negative Regulatoren des JAK/STAT-Signaltransduktionswegs, indem sie die Phosphorylierung der STAT-Proteine und damit die Aktivierung dieser



Transkriptionsfaktoren hemmen. Die Hemmung der Phosphorylierung durch die SOCS-Proteine erfolgt zum einen durch eine direkte Hemmung der katalytischen Aktivität der JAK, zum anderen durch Bindung an den Rezeptor und eine damit verbundene Blockade der STAT-Bindung durch SOCS-Proteine. Ein weiterer Regulationsmechanismus der SOCS-Proteine stützt sich auf deren Fähigkeit, andere Stoffe wie die Januskinase oder Rezeptoren in den Ubiquitin-vermittelten Abbau zu lenken (siehe Abb. 2) (58;59;60).

Abb 2:

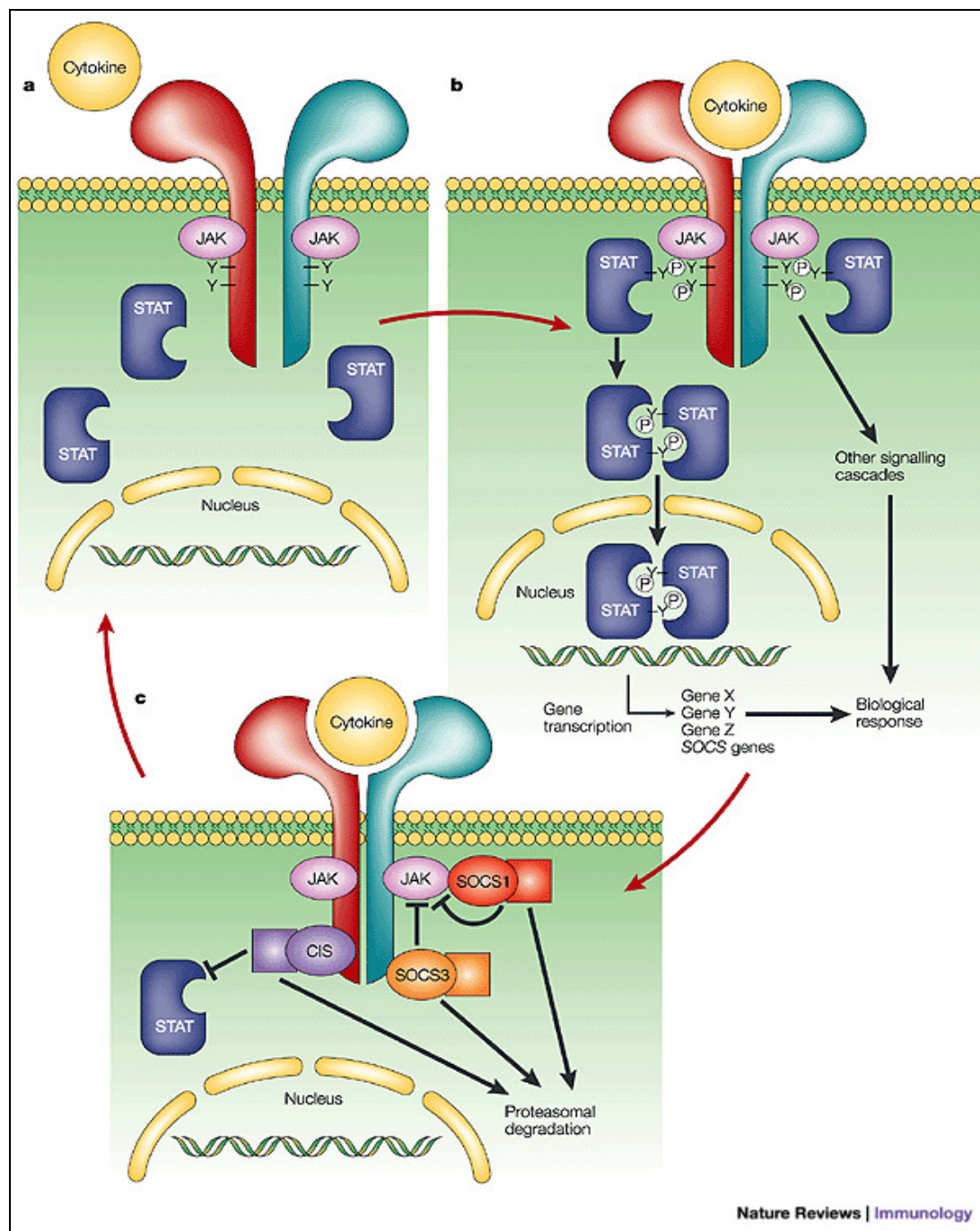


Abb. 2 a,b,c zeigt den Mechanismus der zellulären Zytokin Signalübertragung mittels des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges. Nach der Zytokinbindung an den Rezeptor kommt es zur Aktivierung der Januskinase (JAK) und dadurch zur Phosphorylierung des Signal Transducer und Activator of Transcription-Proteins (STAT). Das STAT-Protein gelangt als Dimer in den Zellkern und aktiviert dort unter anderem die Transkription von Genen, die für Supressor Of Cytokine Signalling-Proteine (SOCS) kodieren. Die Proteine der SOCS-Gruppe (SOCS1, SOCS3 und CIS) hemmen die zelluläre Zytokin-Signalübertragung im Sinne eines negativen Rückkopplungsmechanismus (58).

#### **1.4.1.1 Signal Transducers and Activators of Transkription (STAT)**

Bislang sind sieben Mitglieder der Familie der STAT-Proteine bekannt: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B und STAT6. Alle diese Mitglieder haben eine Größe zwischen 750 und 950 kD, und eine src-homology-2-Domäne, die durch Tyrosin-Phosphorylierung aktiviert wird. Durch diese Phosphorylierung bilden sich STAT-Dimere, welche als Transkriptionsfaktoren dienen. Über diesen Mechanismus sind die STAT-Proteine an der Regulation verschiedenster biologischer und physiologischer Prozesse durch unterschiedliche Mediatoren beteiligt (61;62;57). Studien zeigen eine zentrale Rolle von STAT3 bei der zellulären Signalübertragung der inflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-10 (63;64).

#### **STAT 3**

STAT3 scheint ein wichtiger Regulator der pro- und antiinflammatorischen Wirkung von Zytokinen in Entzündungsprozessen zu sein, da der Signalübertragungsweg von sowohl pro- (IL-6) als auch antiinflammatorischen (IL-10) Zytokinen über die Aktivierung von STAT3 vermittelt wird (63). Die inflammatorische Wirkung von STAT3 unterscheidet sich in Abhängigkeit von der Zellart und dem Herkunftsgewebe. STAT3 fördert bei T-Zellen die proinflammatorische Antwort auf den Entzündungsprozess durch Steigerung der Proliferation und des Überlebens. Bei B-Zellen bewirkt es eine erhöhte Antikörperproduktion (65;66). Im Knockout-Modell der Maus konnte eine antiinflammatorische Wirkung von STAT3 in Makrophagen und Neutrophilen gezeigt werden: Ein Ausschalten von STAT3 bewirkt eine Hyperaktivität mit Steigerung der Zytokinproduktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 und IL-6, sowie die Entwicklung von entzündlichen Darmerkrankungen (67). Weitere STAT3-Deletionsmodelle mit Zellen des Knochenmarks zeigten ebenfalls eine Überproduktion von inflammatorischen Zytokinen, eine erhöhte Proliferation von

Myeloidzellen, sowie die Entwicklung entzündlicher Darmerkrankungen (68). Peritonealmakrophagen zeigen sich in Abwesenheit von STAT3 aktiviert und produzieren inflammatorische Mediatoren. Zudem kommt es zu einer Verminderung der IL-10-Produktion, dessen Transkriptionsfaktor STAT3 ist (69). Die Abwesenheit von STAT3 hemmt im Mausmodell die Regeneration der hepatischen Inflammation nach hämorrhagischem Schock (70). Versuche mit humanen Blutmakrophagen zeigten eine STAT3-Aktivierung durch IL-6 und IL-10 sowie eine Induzierung der von diesem Transkriptionsfaktor abhängigen Gene (71).

Bei inflammatorisch bedingten Erkrankungen wurden Veränderungen der Aktivität von STAT3-Proteinen beobachtet. So konnte bei Morbus-Crohn-Patienten eine basale Phosphorylierung und damit Aktivierung von STAT3-Proteinen in T-Zellen nachgewiesen werden. Die STAT3-Aktivität in Monozyten aus Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis zeigte sich ebenfalls erhöht. Es wird angenommen, dass in diesem Zusammenhang IL-6 als stärkster stimulierender Faktor für STAT3 wirkt (72;73). STAT3 hat jedoch auch eine autoregulatorische Wirkung, so ist eine cAMP vermittelte STAT3-Genaktivierung durch STAT3 selbst beschrieben (134).

#### **1.4.1.2 Supressors of Cytokine Signalling (SOCS)**

Es sind acht verschiedene Proteine der SOCS-Familie bekannt: SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4, SOCS5, SOCS6, SOCS7 und das *Cytokine-Induced SRC-homology 2 Protein* (CIS). Alle Mitglieder dieser Proteinfamilie haben den gleichen Aufbau mit einer zentralen SRC-homology 2 (SH2) Domäne und einer carboxy-terminalen 40-Aminosäure-Sequenz, die als SOCS-Box bezeichnet wird. Die Unterschiede der einzelnen Proteine liegen in der amino-terminalen Domäne, welche in ihrer Länge und Sequenz variiert. Da die SOCS-Proteine von verschiedenen Laboren beschrieben wurden, sind sie auch unter den Namen *Januskinase-Binding Protein* (JAB), *Cytokine-Induced SRC-Homology 2 Protein* (CIS), *Nck Ash and*

*Phospholipase-C Binding Protein* (NAP4) und *STAT-Induced STAT Inhibitor* (SSI) in der Literatur zu finden. Die Proteine der SOCS-Familie hemmen die Signatransduktion von Mediatoren durch einen negativen Rückkopplungs-Kreislauf (siehe 1.4.1) und werden von verschiedenen Zytokinen in unterschiedlichen Zelltypen induziert (74). Im inflammatorischen Entzündungsprozess sind die Proteine SOCS1 und SOCS3 die potentesten Inhibitoren des Zytokin-Signallings (75).

## **SOCS1**

Die Expression von SOCS1 kann durch Stimulation mittels LPS, aber auch durch zahlreiche Zytokine induziert werden. *In vitro*-Studien zeigten, dass SOCS1-Proteine in der Lage sind, unterschiedliche Transduktionswege zu hemmen und nicht auf einen spezifischen Mechanismus limitiert sind (76;77). Versuche mit SOCS1-defizienten Mäusen zeigten retardiertes Wachstum, Lymphozytopenie, Aktivierung peripherer T-Zellen und ein Versterben der Versuchstiere innerhalb von drei Wochen nach der Geburt durch eine fortgeschrittene Entzündungsreaktion mit Makrophagen-Infiltration in die großen Organe und Lebernekrosen (78;79;80). Der Verlust von SOCS1 bei adulten Tieren führte zur Entwicklung von polyzystischen Nieren, Lungenentzündungen, chronischen Hautulcera und chronischen Granulomen im Darm und in anderen Organen (81). In Erkrankungen des zentralen Nervensystems wurde eine dämpfende Wirkung von SOCS1 auf die Expression inflammatorischer Zytokinen beschrieben (82). Ebenso konnte gezeigt werden, dass SOCS1 das Interferon-Gamma-Signalling abschwächt und dessen Produktion kontrolliert (83). SOCS1 reguliert auch die Signalübertragung von inflammatorischen Zytokinen. Die Signalübertragung von IL-6 wird durch SOCS1 gehemmt, indem es mit der Januskinase (JAK) interagiert und so die Phosphorylierung und damit die Aktivierung des IL-6 Rezeptors hemmt (84;85;86). Ebenso induziert IL-10 das SOCS1-Protein, das wiederum als

Rückkopplungs-Protein die IL-10 Signalübertragung hemmt (87). Diese Ergebnisse zeigen, dass SOCS1 ein wichtiges antiinflammatorisches Protein ist, welches der Anfälligkeit von Geweben gegenüber Entzündungen entgegenwirkt (72).

### **SOCS 3**

Das Protein SOCS3 wird in verschiedenen Zellen exprimiert und zeigt in diesen unterschiedliche Wirkungen. SOCS3-Deletions-Versuche ergaben ein embryonales Versterben der Versuchstiere durch insuffiziente Plazentabildung sowie Defekte in der Erythropoese. Adulte Leberzellen und Makrophagen zeigen nach IL-6-Stimulation unter Abwesenheit von SOCS3-Proteinen eine verlängerte Aktivität der Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT3 im Vergleich zu Wildtyp-Zellen (88). Diese verlängerte Aktivität der Transkriptionsfaktoren korreliert auch mit einer erhöhten Sensitivität von Makrophagen auf IL-6 und den dadurch vermittelten proliferativen Effekten (84). Da die SOCS3-Expression von STAT3 reguliert wird, scheinen Veränderungen in der IL-6 Reaktion von STAT3 defizienten Zellen durch ein Fehlen der SOCS3-Synthese begründet zu sein (74;89). Im Herz scheint die Abwesenheit von SOCS3 eine durch IL-6 geförderte Hypertrophie zu verhindern (90). Neben IL-6 wird die Expression von SOCS3-Proteinen unter anderem von IL-10 und LPS induziert. SOCS3 spielt eine zentrale Rolle in der negativen Rückkopplungsregulation im Rahmen der IL-10 induzierten STAT3-Signaltransduktion (91). Bisher gibt es noch keine Erkenntnisse über die SOCS/STAT-vermittelte Zytokin-Rückkopplungsregulation in humanen Immunzellen nach einem Polytrauma.

## 2 Zielsetzung

Wird ein schweres Polytrauma initial überlebt, entwickeln die betroffenen Patienten im weiteren Verlauf eine komplexe systemische Entzündungsreaktion, welche in ein Multiorganversagen münden kann. Dieses geht noch immer mit einer hohen Letalitätsrate einher. Inflammatorische Zytokine und deren Wirkung auf Zellen des angeborenen Immunsystems spielen bei der Auslösung und Regulation dieser posttraumatischen Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle (31). Forschungen auf zellulärer Ebene zeigten, dass die Signalübertragung dieser Zytokine durch Aktivierung des *Januskinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK/STAT)* Signaltransduktionswegs stattfindet. Dieser Weg der Signalübertragung initiiert über die Gruppe der STAT-Proteine als Transkriptionsfaktoren zahlreiche Effektorgene. Unter diesen Effektorgenen befinden sich auch die Gene der *Supressor of Cytokine Signalling (SOCS)*-Proteine. Die SOCS-Proteine hemmen wiederum die Aktivierung der STAT-Proteine und damit die zelluläre Signalübertragung im Sinne eines negativen Rückkopplungsmechanismus. Zudem ist für STAT3 eine autoregulatorische Rolle durch Induktion des eigenen Gens beschrieben (134).

Ziel dieser Studie war es, einen möglichen Einfluss dieses Regelmechanismus und die damit verbundene Dynamik der beteiligten Mediatoren in der frühen posttraumatischen Phase nach schwerem Polytrauma an aus Blut isolierten Monozyten und Granulozyten zu untersuchen. Folgenden Fragen wurde nachgegangen:

- I. Lässt sich in Monozyten und Granulozyten gesunder Probanden eine basale mRNA-Expression der STAT/SOCS-Signalkaskade in Zusammenhang mit IL-6 und IL-10 nachweisen und welche Veränderungen ergeben sich nach artifizieller Stimulation mittels LPS? Gibt es Hinweise auf eine mögliche Etablierung der LPS-Stimulation als Positivkontrolle im JAK/STAT-Signaling?
- II. Wie verhalten sich die mRNA-Expressionen von STAT3, SOCS1, SOCS3, IL-6 und IL-10 in Monozyten und Granulozyten polytraumatisierter Patienten in der frühen posttraumatischen Phase?
- III. Gibt es gemeinsame klinische Faktoren, die eine Veränderung der mRNA- Expression von STAT3, SOCS1, SOCS3, IL-6 und IL-10 in Monozyten und Granulozyten polytraumatisierter Patienten bewirken (Verletzungsschwere, Überleben)?



### **3 Patienten und Methoden**

#### **3.1 Untersuchungskollektiv**

In diese Studie wurden 20 Polytrauma-Patienten eingeschlossen, die in das Level 1 Traumacenter, Chirurgische Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität, Klinikum Innenstadt eingeliefert wurden. Alle eingeschlossenen Patienten hatten einen *New Injury Severity Score (NISS)* von mehr als 16 Punkten und das erlittene Trauma lag weniger als 90 Minuten zurück. Ausschlusskriterien waren ein Alter <15 und >70 Jahren sowie ein isoliertes Schädelhirntrauma. Es wurden klinische Daten bezüglich Alter, Geschlecht, Verletzungsmuster und klinischem Outcome dokumentiert.

#### **3.2 Kontrollgruppe**

Als Kontrollgruppe dienten fünf gesunde Normalprobanden im Alter zwischen 23 und 26 Jahren. Den Probanden wurde wie den Patienten 30ml EDTA-Blut abgenommen und streng nach Protokoll weiterverarbeitet. Diese Proben dienten als Negativkontrolle, um die Ergebnisse des Patientenkollektivs nach Polytrauma gegenüber der Ausgangsexpression zu verdeutlichen.

Um eine Reaktion der mRNA-Expression der am JAK/STAT-Regulationsmechanismus beteiligten Mediatoren auf ein schweres Polytrauma einordnen zu können, sollte der Vergleich mit einer möglichen Positivkontrollgruppe erfolgen. So ist nach einer Stimulation von Monozyten mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) eine Steigerung der Expression von IL-10, SOCS1 und SOCS3 sowie eine Aktivierung von STAT3 beschrieben (135;136;137;138). In Granulozyten soll es hingegen nach LPS-Stimulation nicht zu einer Aktivierung von STAT3 und dessen Signaltransduktionswegs kommen (139). Um Hinweise über eine mögliche Positivkontrolle durch eine LPS-Stimulation zu generieren wurde Vollblut

der gesunden Normalprobanden mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS), wie bereits in der Literatur vorbeschrieben, stimuliert (92;93). Hierfür wurden Blutproben der Normalprobanden nach Entnahme mit 10%igem LPS (1mg pro ml) für 3 Stunden unter stetigem Drehen im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die mRNA-Gewinnung streng nach Studienprotokoll.

### **3.3 Score-Systeme**

#### **3.3.1 New Injury Severity Score**

Der *New Injury Severity Score (NISS)* ist ein rein anatomischer Traumascore, der 1997 von Osler et al aus dem *Injury Severity Score (ISS)* entwickelt wurde und eine bessere Vorhersage eines Multiorganversagens und der Mortalität erlaubt (94;95). In die Berechnung des NISS gehen die drei schwersten Verletzungen eines Unfallopfers ein. Der Unterschied zum ISS ist die Berücksichtigung dieser unabhängig von den verletzten Körperregionen; es können folglich auch mehrere Verletzungen der gleichen Körperregion einbezogen werden. Jede Verletzung erhält einen Wert nach der *Abbreviated Injury Scale (AIS)*. Die AIS beinhaltet Werte von 1 bis 6 analog zur Schwere der Verletzung. Eine leichte Verletzung entspricht einem Wert von 1, schwerste Verletzungen einem Maximalwert von 6. Der NISS errechnet sich durch Quadratur der AIS Werte, die drei höchsten resultierenden Werte werden anschließend addiert:  $((a \text{ AIS})^2 + (b \text{ AIS})^2 + (c \text{ AIS})^2 = \text{NISS})$ . Er kann Werte zwischen 3 und 75 einnehmen (96).

### **3.4 Materialgewinnung**

Zur Probengewinnung wurde polytraumatisierten Patienten 3 x 10 ml EDTA-Blut aus einem liegenden arteriellen Zugang nach festem Zeitschema abgenommen. Die initiale Blutentnahme erfolgte innerhalb 90 Minuten nach Trauma, weitere Blutentnahmen folgten

standardisiert jeweils 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Trauma. Im Anschluss an die Blutentnahme wurden die Proben direkt weiterverarbeitet.

### **3.5 Zellisolierung**

#### **3.5.1 Erythrozytenlyse**

Zur Lyse der Erythrozyten wurde das EDTA-Blut jeweils auf ein Gesamtvolumen von 50 ml mit Erythrozyten-Lyse-Puffer bestehend aus 155 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mM  $\text{KHCO}_3$  und 0,1 M EDTA aufgefüllt. Anschließend folgte eine Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur gefolgt von einer zehnminütigen Zentrifugation (450g, 20°C). Nach einer weiteren Lyse mit 5 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer und einem Waschschrift mit PBS-Puffer, bestehend aus 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 500 mM EDTA und 0,01 M Phosphatpuffer, wurden die Pellets mit 500  $\mu\text{l}$  PBS-Puffer resuspendiert.

#### **3.5.2 Zellseparation mittels magnetischer Zellsortierung (MACS)**

Zur Isolierung der Monozyten und Granulozyten wurde die positive immunomagnetische Separations-Technologie *MACS* (*Magnetic Cell Sorting*) verwendet. Bei dieser Methode binden ferromagnetische Antikörper (*MicroBeads*) an spezifische Oberflächenantigene der Zellen. Die markierten Zellen laufen durch eine Trennsäule, die sich in einem Magnetfeld befindet. Antikörperbeladene Zellen bleiben in der Säule haften, nicht markierte Zellen laufen hindurch. Im Anschluss wird die Säule aus dem Magnetfeld genommen und mit einem Stempel werden die markierten Zellen aus der Säule eluiert.

Zuerst wurden die Monozyten mittels Anti-CD14-MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) aus der Suspension separiert. Die Proben wurden mit 200  $\mu\text{l}$  MicroBeads pro  $10^7$  Zellen 15 Minuten bei 4°C inkubiert, gefolgt von einem Waschschrift mit PBS-Puffer und Zentrifugation (5 min, 450 g, 20°C). Das Pellet wurde mit 500  $\mu\text{l}$  PBS-Puffer

resuspendiert und auf die zuvor mit 500 µl PBS-Puffer angefeuchtete MACS-Säule (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) gegeben. Im Anschluss wurde die Säule mit 3 x 500 µl PBS-Puffer gespült. Nach dem Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld wurden die angereicherten Monozyten mit 2 x 1000 µl PBS-Puffer eluiert. Zur Extraktion der Granulozyten erfolgte die Inkubation mit Anti-CD15-MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) für 15 Minuten. Die Granulozytenseparation erfolgte in analoger Weise mittels MACS-Säulen LS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland). Die Spülschritte erfolgten jeweils mit 3 x 3 ml PBS-Puffer und 2 x 5 ml PBS-Puffer. Die gewonnenen Monozyten und Granulozyten wurden zur Konservierung nach Zentrifugation (5 min, 450 g, 20°C) jeweils in 2ml β-Mercaptoethanol-RTL-Puffer bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C eingefroren.

Nach der Erythrozytenlyse wurde die Zellseparation auf Eis durchgeführt, um eine Beeinflussung der Zellfunktionen möglichst gering zu halten.

### 3.6 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung wurde mittels des RNeasy Midi Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Diese Methode macht sich die Bindeeigenschaften der RNA an eine Silica-Gel-Membran zueigen. Die RNA wird gebunden und in verschiedenen Waschschritten werden Proteine und DNA abgetrennt.

Die Proben wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und anschließend mit 2 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol-RTL-Puffer (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) suspendiert. Anschließend erfolgte die mechanische Lyse. Um eine Bindung der RNA an die Ionenaustauschersäule des Kits zu gewährleisten, wurden 4 ml Ethanol (70%) (Merk, Darmstadt, Deutschland) zugegeben. Die Proben wurden auf die Säulen gegeben und zentrifugiert (5 min, 5000g, 20°C). Es folgte ein Waschschriff mit 4ml RW1 Waschpuffer des Kits. Um eine spätere DNA-Kontamination möglichst gering zu halten, wurde im Anschluss ein DNA-Verdau mittels DNase durchgeführt. Hierfür wurden 160  $\mu$ l des DNase-Reaktionsgemisches (RNase-Free DNase Set, Qiagen, Hilden, Germany) auf die Säule pipettiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 2 ml RW1-Waschpuffer auf die Säule gegeben und erneut 5 Minuten inkubiert mit anschließender Zentrifugation (5 min, 5000 g, 20°C). Es wurden im Anschluss 2 x 2,5 ml RPE-Puffer des Kits auf die Säule gegeben und zuerst 2 Minuten und dann 5 Minuten zentrifugiert (5000 g, 20°C). Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt zur Trocknung (3 min, 5000 g, 20°C) wurde die RNA durch Zugabe von 200  $\mu$ l RNase-freien Wassers, einminütiger Inkubation und dreiminütiger Zentrifugation (5000g, 20°C) eluiert. Dieser Schritt wurde anschließend mit 200  $\mu$ l RNase freien Wassers wiederholt und die Proben bis zur Messung bei -80°C eingefroren.

### 3.7 Konzentrationsbestimmung der RNA

Die RNA-Konzentration wurde durch eine photometrische Messung bei einer Wellenlänge von  $\lambda=260$  nm durchgeführt. Bei einer Wellenlänge von  $\lambda=260$  nm entspricht eine Extinktion von 1 einer RNA-Konzentration von 40 ng/ $\mu$ l.

### 3.8 cDNA Synthese

Um die gewonnene mRNA mittels RT-PCR messbar zu machen, wurde sie mit dem 1<sup>st</sup> Strand cDNA Syntheseis Kit for RT-PCR (Roche, Mannheim, Deutschland)) in stabilere cDNA umgeschrieben. Bei dieser Methode positioniert sich ein Oligo-p(dT)<sub>15</sub>-Primer an das 3'-Ende der RNA und ermöglicht der AMV (*Avian Myeloblastosis Virus*)-Reverse-Transkriptase die RNA von dieser Stelle in DNA umzuschreiben. Im Ansatz sind die hierzu benötigten Trinukleotide, MgCl<sub>2</sub> sowie ein den Abbau der RNA stoppender Inhibitor (RNase Inhibitor) enthalten. Die Proben wurden auf 1  $\mu$ g in 8,2  $\mu$ l mittels Verdünnen oder Eindampfen standardisiert.

Zunächst wurden die Proben (1  $\mu$ g RNA in 8,2  $\mu$ l) im Thermocycler für 15 Minuten bei 65°C denaturiert um die Sekundärstruktur der RNA zu zerstören und dadurch ein besseres Anlagern des Primers zu ermöglichen. Nach der Denaturierung wurden die Proben 5 Minuten auf Eis abgekühlt und im Anschluss 11,8  $\mu$ l des im Kit enthaltenen Mastermixes bestehend aus MgCl<sub>2</sub>, Desoxynukleotide-Mix, Oligo-p(dt)<sub>15</sub> -Primer, AMV-Reverse-Transkriptase und RNase-Inhibitor hinzupipettiert. Im Anschluss erfolgte die PCR nach dem in **Tab. 1** dargestellten Ablauf. Die Proben wurden nach Durchlaufen der PCR bei -20°C bis zur Messung gelagert.

**Tab. 1:** Programmablauf der PCR für die cDNA-Synthese

Schritt	Temperatur	Zeit	Vorgang
1	25°C	10 Min	Annealing
2	42°C	60 Min	Transkription
3	99°C	5 Min	Denaturierung des AMV Enzyms
4	4°C	5 Min	Abkühlen
5	4°C	$\infty$	

### 3.9 Quantitative RT-PCR

Der *Light Cycler* benützt eine PCR-Technik, die Amplifikation, Detektion und Quantifizierung der zu untersuchenden cDNA Sequenzen in einem Ansatz ermöglicht. Hierfür verwendet er den Fluoreszenzfarbstoff *Sybr Green I*. Dieser Farbstoff lagert sich an Doppelstrang-DNA an und fluoresziert nur in gebundener Form. Der Farbstoff wird durch eine Lichtquelle angeregt. Das so hervorgerufene Fluoreszenz-Signal korreliert in der log-linearen Phase der PCR quantitativ mit der Menge des PCR-Produktes. Diese Menge stellt der *Light Cycler* in Echtzeit dar. Der Punkt, an dem das gemessene Fluoreszenzsignal zum ersten Mal signifikant über dem Hintergrundsignal liegt, wird als Crossing Point (CP) definiert. Für die weitere Berechnung der Quantifizierung wurde der CP-Wert verwendet. Die absolute Quantifizierung wird über einen externen Standard ermöglicht. Dieser Standard ist eine cDNA-Probe, deren Sequenz mit der des Zielgens übereinstimmt und deren Konzentration bekannt ist. In der PCR wird eine Verdünnungsreihe dieses Standards mitgeführt und eine Standardkurve konstruiert. Über die Standardkurve ermittelt das Gerät Absolutwerte (Kopienzahlen) für die Ausgangskonzentrationen unbekannter Proben.

Zur Durchführung der RT-PCR wurde das *LightCycler Fast Start DNA Master Sybr Green I Kit* (Roch, Mannheim, Deutschland) verwendet. Dieses beinhaltet zum einen den Fluoreszenzfarbstoff *Sybr Green I* und zum anderen eine thermostabile Taq-DNA-Polymerase. Diese wird bei hohen Temperaturen aktiviert und verhindert weitgehend die unspezifische Bildung von Primer-Dimeren. Die verwendeten Standards und Primer entstammten *LightCycler* Primer Sets (Search LC, Heidelberg, Deutschland). Die verwendeten Primer waren Intronüberspannend um eine Amplifikation von genomischer RNA zu vermeiden. Von der Firma wurden zu den Primern folgende Angaben gemacht. IL-10: NM\_00572.2, 184-491; STAT3: NM139276.2, 2272-2548; SOCS1: NM\_003745.1, 1006-1114; SOCS3: NM\_003955.4, 822-1096. Es wurde zuerst ein PCR-LC-Mix bestehend aus 6 µl H<sub>2</sub>O, 2 µl LC-Primer Set und 2 µl Master *Sybr Green I* premix pro Probe hergestellt, der dann für den Ansatz mit den 9 µl H<sub>2</sub>O und 1 µl der cDNA-Probe in die Glaskapillaren des *LightCyclers* pipettiert wurde.

Um die Verdünnungsreihe herzustellen, wurden 1,2 µl des Standards aus dem jeweiligen *LightCycler* Primer Set in 10,8 µl eines ebenfalls mitgelieferten Standard-Stabilizers überführt und gemischt (Verdünnung 1:10). Von dieser Verdünnung wurden wieder 1,2 µl in 10,8 µl Standard-Stabilizer überführt usw.. Auf diese Weise wurde folgende Verdünnungsreihe hergestellt: 1:1 / 1:10 / 1:100 / 1:1000 / 1:10000. Eine solche Verdünnungsreihe wurde zur Ermittlung der Standardkurve in jeden PCR-Lauf eingesetzt. Ebenfalls wurde in jedem PCR-Lauf eine Negativkontrolle bestehend aus 10 µl H<sub>2</sub>O und 10 µl PCR-LC-Mix mitgeführt.

Im Anschluss an das Befüllen der Kapillaren wurden diese mit einem Deckel verschlossen und um Blasenfreiheit zu erreichen bei 660 rpm für 4 Minuten bei 4°C zentrifugiert.

Der *LightCycler* wurde nach Einsetzen der Kapillaren mit folgenden Programmschritten gestartet (siehe **Tab. 2**):



Tab. 2: Programmablauf der RT-PCR

### Experimental Protocol

Program:	Denat				Type:	Quantification	Cycles	1
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode	
1	95	600	20	0	0	0	None	

Program:	Ampli				Type:	Quantification	Cycles	45
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode	
1	95	10	20	0	0	0	None	
2	68	10	20	58	0.5	1	None	
3	72	16	20	0	0	0	Single	

Program:	Melt				Type:	Melting Curves	Cycles	1
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode	
1	95	0	20	0	0	0	None	
2	58	10	20	0	0	0	None	
3	95	0	0.1	0	0	0	Continuous	

Program:	Cool				Type:	None	Cycles	1
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode	
1	40	30	20	0	0	0	None	

Fluorescence Settings			
LED Power	CALIB	Display Mode	3.5 Compatible
Color	N/A		
Compensation	N/A		
Car. Movement	Continuous		

Melting Analysis Settings			
Channel Setting	F1/ 1		
Program Name	Melt		
Start Time	0:54:08.45	Stop Time	1:00:24.7

## 3.10 Qualitätskontrolle

### 3.10.1 Schmelzkurven-Analyse

Die Schmelzkurven-Analyse wurde durch den *Light Cycler* im Anschluss an die PCR durchgeführt um die Spezifität der Produkte zu überprüfen. Das Gerät erhitzt die Produkte in 0,1°C-Schritten auf 95°C. Je nach Länge, Guanin- und Cytosin- Zusammensetzung der Fragmente trennen sich die Doppelstränge bei einer für das Produkt spezifischen Temperatur. Bei dieser Temperatur kommt es zu einem abrupten Abfall der Fluoreszenz, die durch den *LightCycler* gemessen und graphisch dargestellt wird. Die *LightCycler*-Software stellt die

Schmelzkurven in der ersten negativen Ableitung ( $-dF/dT$ ) der Fluoreszenz (F) gegen die Temperatur (T) dar. In dieser Darstellung erscheint der Abfall der Fluoreszenz als Spitze und ermöglicht eine leichtere Zuordnung der jeweiligen Schmelztemperaturen zu den analysierten Amplifikaten.

### **3.10.2 Agarose-Gel Elektrophorese**

Die Produkte der RT-PCR wurden zusammen mit einem Größenmarker durch eine Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Hierfür wurde die für ein 1,5%-iges Gel benötigte Menge an Agarose (Cambrex Bio Science, Rockland, USA) in eine Reaktionsflasche eingewogen und mit einer entsprechenden Menge TAE-Puffer in der Mikrowelle (bei 1000W) bis zur Lösung der Agarose erhitzt. Nach Abkühlung unter fließendem Wasser wurden pro 20 ml Gel-Lösung 1  $\mu$ l Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) hinzugegeben. Die Gel-Lösung wurde dann blasenfrei in einen Flachbettgelträger gegossen. Nach der Aushärtung wurde das Gel in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt. Im Anschluss erfolgte das Auftragen der Amplifikationsprodukte und der Größenmarker 100 bp und 250 bp (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), welche vorher mit jeweils 2  $\mu$ l *Blue Juice* Farbstoff (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) gemischt wurden. An die Elektrophoresekammer wurde für 30 Minuten eine Spannung von 100 Volt angelegt und anschließend das Gel unter UV-Bestrahlung fotografiert. Anhand der Banden verglichen mit den Größenmarkern lassen sich Aussagen über die Größe der Amplifikate und damit die Qualität der durchgeführten PCR machen.

### 3.11 Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten wurden in dieser Arbeit als Mittelwerte mit dem Standardfehler der Mittelwerte angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm *SigmaStat* (Version 2.03, SPSS Inc., USA), die graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm *SigmaPlot* (Version 8.0, SPSS Inc., USA).

Zunächst wurden der Friedman-Test (*Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks*) als verteilungsfreies Verfahren zum Vergleich mehrerer abhängiger Stichproben angewandt, um signifikante Unterschiede der Messwerte zu den Messzeitpunkten A, 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden zu ermitteln. Im Falle vorhandener Unterschiede wurde der Student-Newman-Keuls-Test (SNK-Test) durchgeführt.

Nach der Einteilung des Patientenkollektivs anhand klinischer Parameter in Untergruppen wurden die Ergebnisse mit dem nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Test (U-Test) verglichen. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  festgelegt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Klinisch-demographische Daten

In diese Studie wurden 20 polytraumatisierte Patienten mit einem *New Injury Severity Score* (NISS) von mehr als 16 Punkten eingeschlossen. Das Alter der eingeschlossenen Patienten lag im Mittel bei  $40 \pm 2,8$  (MW $\pm$ SEM) Jahren, 13 waren männlich und 7 weiblich. Der mittlere NISS betrug  $40,5 \pm 3,2$  (MW $\pm$ SEM) Punkte. 16 Patienten überlebten und 4 verstarben innerhalb der posttraumatischen Phase. Das Patientenkollektiv wurde nach der Schwere der Verletzungen in eine Gruppe mit weniger als 41 und eine Gruppe mit 41 oder mehr NISS-Punkten eingeteilt. Für die Grenzen zwischen den Gruppen wurde der Median gewählt. Die Grenze beider Gruppen wurde aufgrund des mittleren NISS bei 41 Punkten festgelegt. Die Gruppe der leichter Verletzten bestand aus 9 Patienten, 7 Patienten waren männlich, 2 weiblich. Das mittlere Alter betrug  $45,5 \pm 4,0$  (MW $\pm$ SEM) Jahre, der mittlere NISS lag bei  $27,1 \pm 2,1$  (MW $\pm$ SEM) Punkten. In dieser Gruppe verstarben 2 Patienten innerhalb der posttraumatischen Phase. Die Gruppe der schwerer Verletzten bestand aus 11 Patienten, 6 waren männlich und 5 weiblich. Das mittlere Alter betrug  $37,3 \pm 3,5$  (MW $\pm$ SEM) Jahre, der mittlere NISS lag bei  $52,4 \pm 2,4$  (MW $\pm$ SEM) Punkten. In dieser Gruppe verstarben 2 Patienten innerhalb der posttraumatischen Phase.

Es erfolgte die Einteilung nach dem klinischen Outcome in überlebende und verstorbene Patienten innerhalb von 90 Tagen nach Trauma. Die Gruppe der Überlebenden bestand aus 16 Patienten, 11 männlich und 5 weiblich, mit einem mittleren Alter von  $38,3 \pm 2,9$  (MW $\pm$ SEM) Jahren. Der mittlere NISS lag bei  $40,3 \pm 3,7$  (MW $\pm$ SEM) Punkten. Die Gruppe der Verstorbenen bestand aus 4 Patienten, 2 männlich und 2 weiblich. Das mittlere Alter lag bei  $48 \pm 6,4$  (MW $\pm$ SEM) Jahren. Der mittlere NISS lag bei  $41,3 \pm 6,9$  (MW $\pm$ SEM) Punkten.

Die Kontrollgruppe bestand aus 5 gesunden Probanden mit einem mittleren Alter von  $24,6 \pm 0,51$  (MW $\pm$ SEM) Jahren, 2 waren männlich und 3 weiblich (siehe **Tab. 3**).

**Tab. 3:** *Klinische Daten der eingeschlossenen Polytraumapatienten*

Nr.	Alter	Geschlecht	NISS	Verletzungsmuster	Outcome
1	34	M	57	Bilat. intracranielles Hämatom, subdurales Hämatom, Lungenkontusion, Hämatopneumothorax, A. iliaca int.-Ruptur, retroperitoneales Hämatom, retroperitoneale Ruptur, Ileumkontusion, Nierenkontusion, Skapulafraktur, Beckenringfraktur, Femurfraktur, Tibiafraktur, Fibulafraktur, Patellafraktur	überlebt
2	39	W	50	Dislozierte HWK 5 Fraktur mit Rückenmarkssyndrom, Proc. Transversus Fraktur HWK 2 ,3 und 6, Lungenkontusion, BWK-Fraktur, Schulterluxation, Weichteilverletzung des Auges	überlebt
3	32	W	66	Bilat. subdurales Hämatom, intracerebrales Hämatom, Nasenbeinfraktur, Lungenkontusion, Pneumothorax, Rippenserienfraktur C5-9, Milzruptur, dislozierte Beckenringfraktur mit Ruptur der A. iliaca, Humerusfraktur, Weichteilverletzungen am Schädel	überlebt
4	63	W	27	Offene Femurfraktur bds., Femoralvenenruptur, Kreuzbandruptur	verstorben
5	62	M	27	Lungenkontusion, Rippenfraktur C9, Milzruptur, Mesenterialruptur, Jejunumkontusion, Femurfraktur	überlebt
6	45	M	19	Thoraxkontusion, Unterschenkelamputation, dislozierte Femurfraktur	überlebt

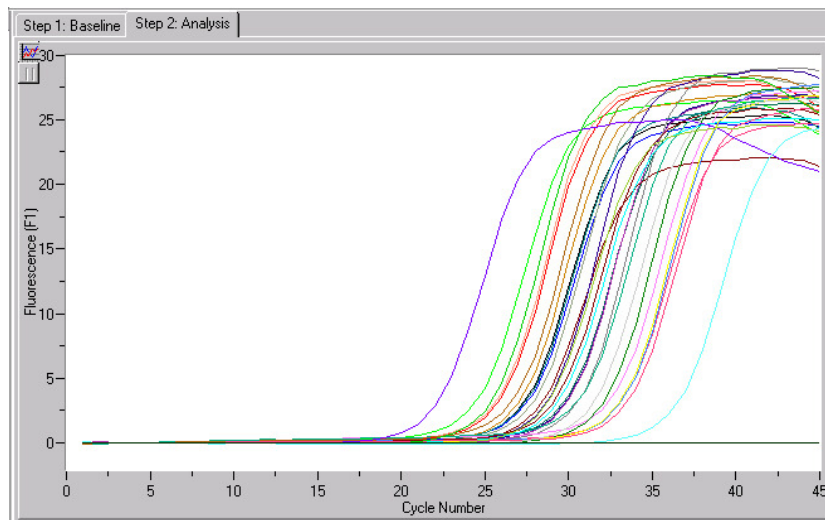
Nr.	Alter	Geschlecht	NISS	Verletzungsmuster	Outcome
7	51	M	29	Epidurales Hämatom, subdurales Hämatom, Lungenkontusion, Rippenserienfraktur C3-5, LWK 1 und 4 Fraktur, Scapulafraktur	überlebt
8	25	W	57	Subdurales Hämatom, intracranielle Blutung, Hirnödem, Axisfraktur, Lungenkontusion, Rippenfraktur C3 und 8, Zwerchfellruptur, Nierenruptur, Leberruptur, Milzruptur, Beckenfraktur, LWK 2-5 Fraktur	überlebt
9	57	M	57	Subarachnoidales Hämatom, intracerebrale Blutung, Mittelgesichtsfraktur, Rippenserienfraktur C5-7 und 9, Hämatothorax, Sternumfraktur, Ileumdevascularisation, Femurfraktur, Tibiafraktur	überlebt
10	51	W	57	Subdurales Hämatom, intracerebellare Blutung, subarachnoidales Hämatom, Rippenserienfraktur C7-12, Hämatopneumothorax, Leberruptur	verstorben
11	39	M	17	Rippenserienfraktur C5-7, LWK 3 Fraktur, Amputation der unteren Extremität	überlebt
12	42	W	41	Subarachnoidales Hämatom, Hirnödem, subdurales Hämatom, Nasenseptumfraktur, Lungenkontusion, Unterarmtrümmerfraktur	überlebt
13	40	M	41	Proc. transversus Fraktur HWK 7 und LWK 5, LWK 1 und 2 Fraktur, dislozierte Beckenfraktur, Pilon tibiale Fraktur, OSG-Fraktur,	überlebt
14	15	M	48	Subdurales Hämatom, Hirnödem, Lungenkontusion, Claviculafraktur	überlebt
15	32	M	43	Lungenzerreiung, Pneumothorax, Femurfraktur, offene Tibiafraktur	überlebt

Nr.	Alter	Geschlecht	NISS	Verletzungsmuster	Outcome
16	49	M	33	Rippenserienfraktur, Hämatothorax, Lungenkontusion, Unterschenkelamputation, Femurfraktur	verstorben
17	32	M	48	A. cerebri posterior Verschluss, Orbitafraktur, Pneumothorax, Mesenterialruptur, Aortendissektion, Leberruptur, Sigmaruptur, Femurfraktur, Tibiafraktur	verstorben
18	28	W	34	Rippenserienfraktur C10-12, Pneumothorax, Vaginalabriss, offene Femurfraktur, Beckenfraktur mit retroperitonealem Hämatom, Becken und Oberschenkel Decollement	überlebt
19	39	M	24	Rippenserienfraktur C2-5, Pneumothorax, Subkapsuläres Milzhämatom, Humerusfraktur	überlebt
20	33	M	34	Rippenserienfraktur C6-9, Lungenkontusion, Mesenterialruptur, Ileumdevaskularisation, Humerusfraktur, offene Tibiafraktur	überlebt

## 4.2 Spezifitätskontrollen

Nach den durchgeführten Messungen mittels quantitativer RT-PCR wurden die einzelnen PCR-Läufe durch eine mitgeführte Negativkontrolle bewertet. **Abb. 3** zeigt exemplarisch den Verlauf der Amplifikations-Signale eines *LightCycler* PCR-Laufes. Die schwarze horizontale Linie stellt die Negativkontrolle dar, die restlichen Kurven entsprechen den Fluoreszenzkurven der Proben und der Standardreihe. Es zeigt sich im Verlauf keine Fluoreszenzsteigerung der Negativkontrollen und damit auch keine Verunreinigung des Ansatzes mit cDNA.

**Abb 3:**



*Abb. 3 zeigt den exemplarischen Verlauf der Amplifikations-Signale eines LightCycler PCR-Laufes. Die schwarze horizontale Linie stellt die Negativkontrolle dar. Ihr Fluoreszenzniveau ändert sich während des PCR-Laufes nicht, das bedeutet, der Ansatz war nicht verunreinigt. Die restlichen Kurven entsprechen den Fluoreszenzkurven der Proben und der Standardreihe.*

Im Anschluss an jede durchgeführte RT-PCR-Messung erfolgte eine Spezifitätskontrolle durch eine Schmelzkurvenanalyse. Hierbei werden die Amplifikate im *LightCycler* stufenweise erhitzt, bis sich die Doppelstränge der PCR-Produkte jeweils bei einer für sie spezifischen Temperatur trennen. Infolgedessen kommt es zu einer Auslöschung der Fluoreszenz. Sind die Fluoreszenzwerte und damit die gemessenen Kopienzahlen spezifisch für das zu messende Gen, liegen die Fluoreszenzspitzen aller Proben und der Standardreihe bei der gleichen Temperatur. **Abb. 4** zeigt exemplarisch die graphische Auswertung einer Schmelzkurvenanalyse.



**Abb. 4:**

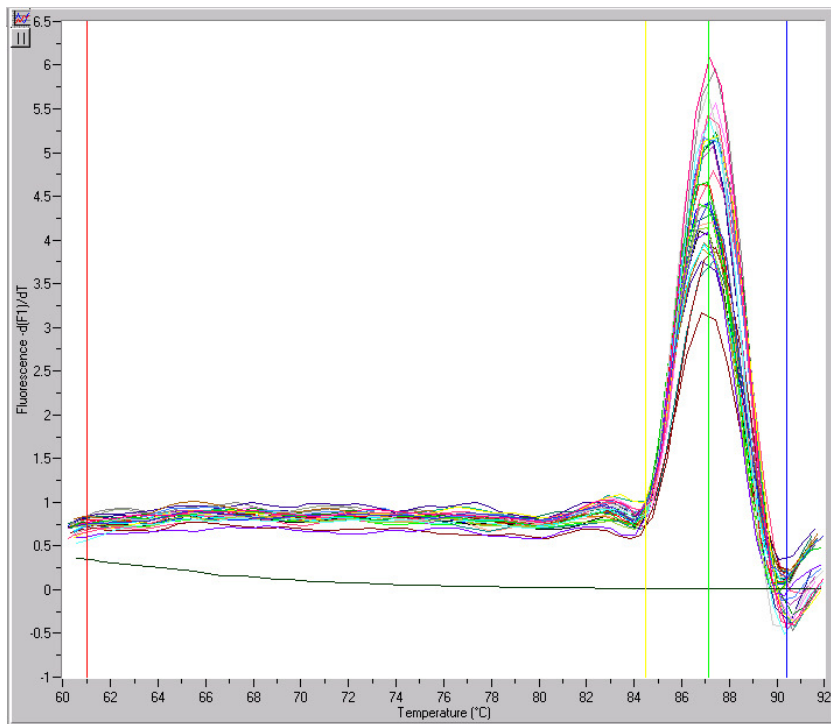
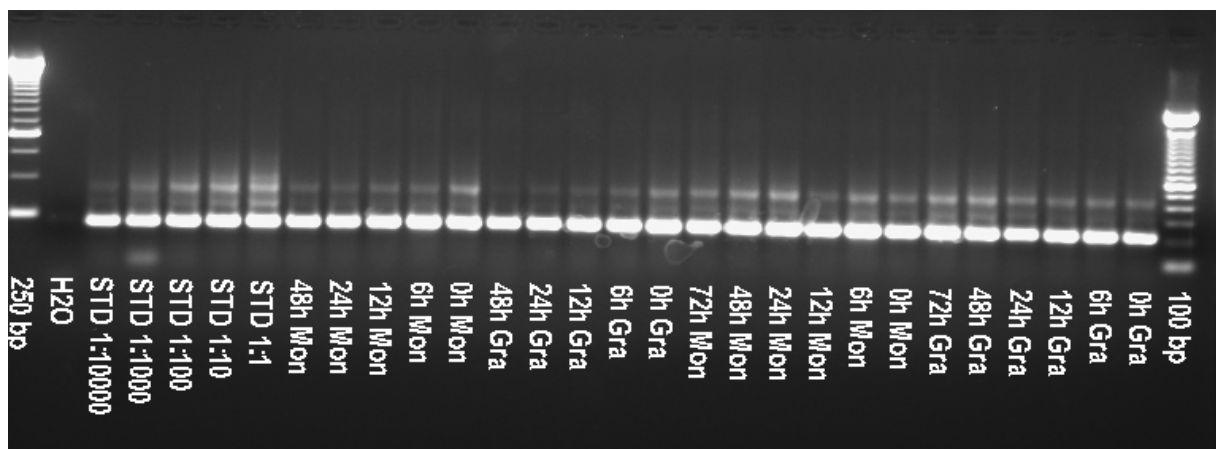


Abb. 4 zeigt die Schmelzkurvenanalyse als Spezifitätskontrolle eines LightCycler PCR-Laufes. Der Peak bei 87,1 °C steht für das Aufschmelzen der spezifischen PCR-Produkte. Die abgelaufene PCR war spezifisch, da die Fluoreszenzspitzen aller Proben bei der gleichen Temperatur liegen.

### 4.2.1 Gel-Elektrophorese

Die Produkte der durchgeführten RT-PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt um die Spezifität der nachgewiesenen Gene zu bestätigen. **Abb. 5** zeigt exemplarisch die Gel-Elektrophorese eines RT-PCR-Laufes von SOCS1. Neben den Proben ist die Standardverdünnungsreihe und Wasser als Negativkontrolle abgebildet. Dabei war bei allen SOCS1 Produkten eine deutliche Hauptbande bei etwas 240bp sichtbar. Durch das Vorliegen von nur einer Hauptbande bei den durchgeführten Elektrophorese-Läufen konnte so die Spezifität des jeweils bestimmten Gens nachgewiesen werden.

**Abb.5:**



*Abb.5 zeigt die Gel-Elektrophorese der Produkte eines RT-PCR-Laufes von SOCS1. Es ist bei allen Proben nur eine Hauptbande des gleichen Gewichtes sichtbar, folglich waren die bestimmten Gene spezifisch.*

### **4.3 IL-6-mRNA-Expression in Monozyten und Granulozyten polytraumatisierter Patienten**

Die Ergebnisse der Interleukin-6-Messungen zeigten keine auswertbaren Ergebnisse. Die durch den *LightCycler* ermittelten Kopienzahlen lagen konstant in sehr niedrigen Bereichen.

### **4.4 IL-10-mRNA-Expression in Monozyten und Granulozyten polytraumatisierter Patienten**

#### **4.4.1 IL-10-mRNA-Expression in Monozyten**

##### **4.4.1.1 IL-10-mRNA-Expression in Monozyten: Kontrollen**

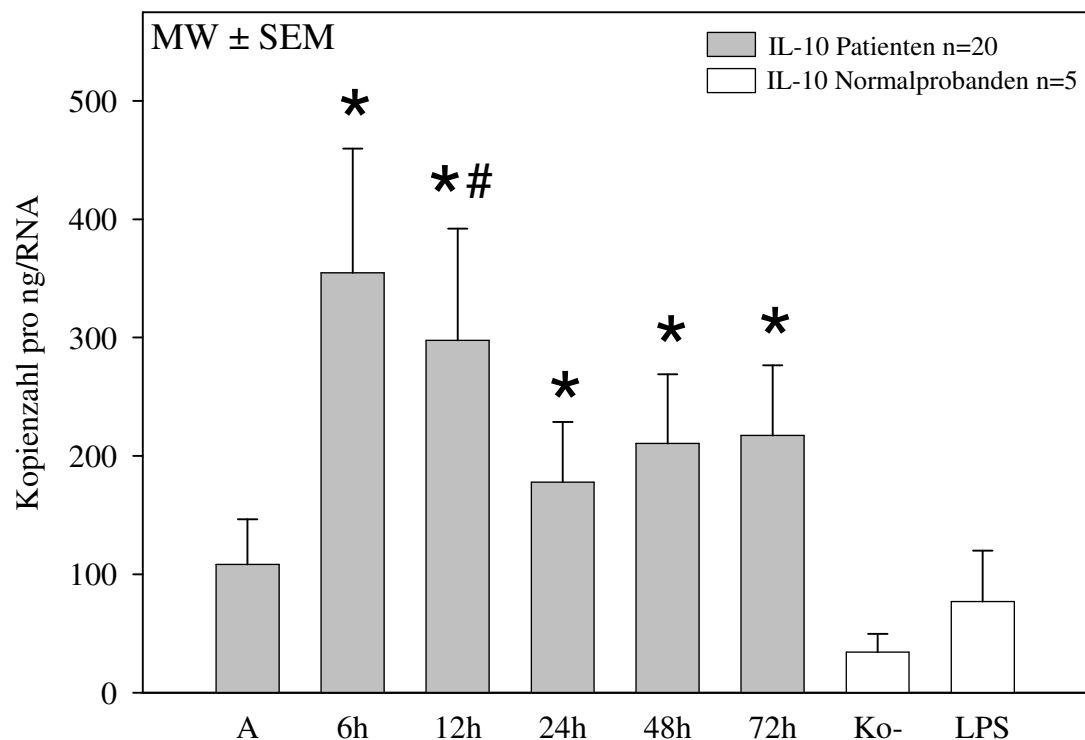
Die IL-10-mRNA Expression in nativen Monozyten der gesunden Probanden betrug  $34 \pm 15$  (MW $\pm$ SEM) pro 50ng eingesetzte RNA. Nach artifizieller Stimulation mit LPS stieg diese auf  $77 \pm 43$  (MW $\pm$ SEM) an. Diese Ergebnisse sind in den folgenden Graphen als Negativkontrolle (Ko-) und LPS dargestellt.

##### **4.4.1.2 IL-10-mRNA-Expression in Monozyten: Gesamtkollektiv**

In **Abb. 6** ist der Verlauf der IL-10-mRNA-Expression in Monozyten polytraumatisierter Patienten graphisch dargestellt. Bereits 6 Stunden nach Trauma steigt die Expression signifikant gegenüber dem initialen Wert A bei Krankenhausaufnahme an. Zu den späteren Abnahmezeitpunkten 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Trauma ist das Expressionsniveau signifikant gegenüber dem initialen Wert A erhöht ( $p < 0,05$  im Student-Newman-Keuls-Test, A vs. 6-72h), fällt gegenüber dem Sechsstundenwert jedoch wieder ab.

Im Vergleich zur gesunden, nativen Kontrollgruppe ist die IL-10-mRNA-Expression 12 Stunden nach Trauma signifikant erhöht ( $p=0,032$  im Mann-Whitney-U-Test). Die Werte sind in **Tab. 4** zusammengefasst.

**Abb. 6:**



IL-10 mRNA in Monozyten, \*  $p < 0,05$  SNK-Test vs. A, #  $p = 0,032$  U-Test vs. Ko-

Abb. 6 zeigt die IL-10-mRNA-Expression in Monozyten des Gesamtkollektivs polytraumatisierter Patienten ( $n=20$ ), sowie der Normalprobanden nativ (Ko-) und LPS stimuliert (LPS). Die IL-10-mRNA-Expression ist bereits 6 Stunden nach Trauma und im weiteren Beobachtungsverlauf gegenüber dem initialen Wert A bei Klinikaufnahme signifikant erhöht.

**Tab. 4:** IL-10-mRNA-Expression in Monozyten Gesamtkollektiv

MW±SEM	A	6h	12h	24h	48h	72h
Patienten: n=20	108 ± 38	355 ± 105	298 ± 95	178 ± 51	211 ± 58	217 ± 124
		*	* #	*	*	*

\*  $p < 0,05$  im SNK -Test A vs. 6-72h; #  $p = 0,032$  im U-Test Ko- vs. 12h

#### **4.4.1.3 IL-10-mRNA-Expression in Monozyten: Einteilung nach der Verletzungsschwere**

Die Einteilung des Patientenkollektivs nach der Verletzungsschwere ist in **Abb. 7** dargestellt. Sie zeigt die IL-10-mRNA-Expression in Monozyten polytraumatisierter Patienten mit einem NISS von weniger und mehr als 41 Punkten. Leichter verletzte Patienten mit einem NISS von weniger als 41 Punkten zeigen 12 und 48 Stunden nach Trauma eine signifikant höhere IL-10-mRNA-Expression als schwerer verletzte Patienten mit einem NISS von mehr als 41 Punkten ( $p < 0,04$  im Mann-Whitney-U-Test). Die IL-10-Expression ist innerhalb der Patienten mit einem NISS von mehr als 41 Punkten signifikant gegenüber dem initialen Zeitpunkt A bei Klinikaufnahme erhöht ( $p < 0,05$  im Student-Newman-Keuls-Test). Die Messwerte sind in **Tab. 5** zusammengefasst.

Abb. 7:

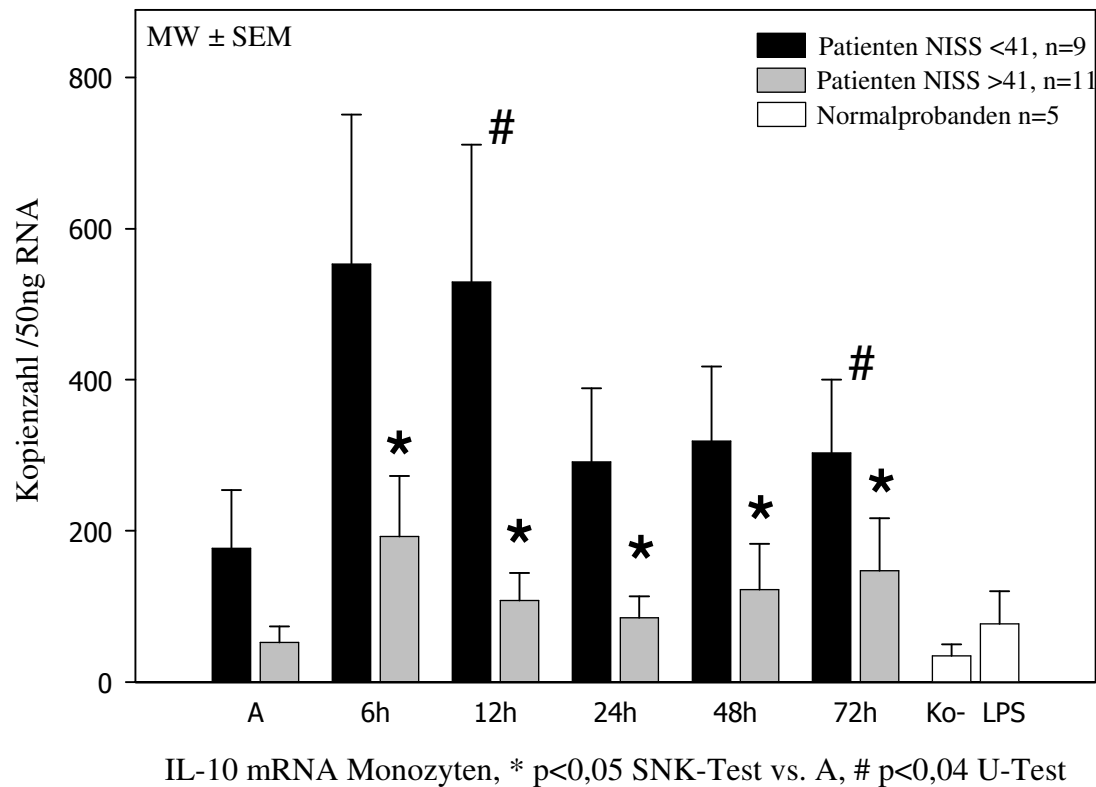


Abb. 7 zeigt die IL-10-mRNA-Expression in Monozyten polytraumatisierter Patienten eingeteilt nach der Verletzungsschwere, sowie in Normalprobanden nativ (Ko-) und LPS stimuliert (LPS). Die IL-10-mRNA-Expression der weniger schwer verletzten Patienten war 12 und 48 Stunden nach Trauma signifikant gegenüber der der schwerer Verletzten erhöht. Patienten mit einem NISS >41 Punkten zeigte 6-72h nach Trauma eine signifikant höhere IL-10-Expression als zum Zeitpunkt A bei Krankenhausaufnahme.

Tab. 5: IL-10-mRNA-Expression in Monozyten unterteilt nach der Verletzungsschwere

MW±SEM	A	6h	12h	24h	48h	72h
NISS < 4: n=9	177 ± 77	553 ± 198	529 ± 182	291 ± 97	319 ± 99	303 ± 97
NISS ≥ 41: n=11	52 ± 21 *	193 ± 80 *	108 ± 36 * #	85 ± 28 *	122 ± 61 * #	147 ± 69 *

\* p<0,05 im SNK-Test NISS ≥ 41 A vs. 6-72h; # p<0,04 im U-Test NISS < 41 vs. NISS ≥ 41

#### **4.4.1.4 IL-10-mRNA-Expression in Monozyten: Einteilung nach dem Outcome**

Die Unterteilung des Patientenkollektivs nach dem klinischen Outcome in Überlebende und Verstorbene, wie in **Abb. 8** dargestellt, zeigt innerhalb der Gruppe der überlebenden Patienten eine signifikant höhere IL-10-mRNA-Expression 6 bis 72 Stunden nach Trauma im Vergleich zum initialen Wert A bei Klinikaufnahme ( $p < 0,05$  im Student-Newman-Keuls-Test). Die Gruppe der verstorbenen Patienten zeigte mit Ausnahme des Zwölfstundenwertes höhere Expressionswerte im Vergleich zu den Überlebenden. Diese Unterschiede waren nicht signifikant. In **Tab. 6** sind die Werte zusammengefasst.

Abb. 8:

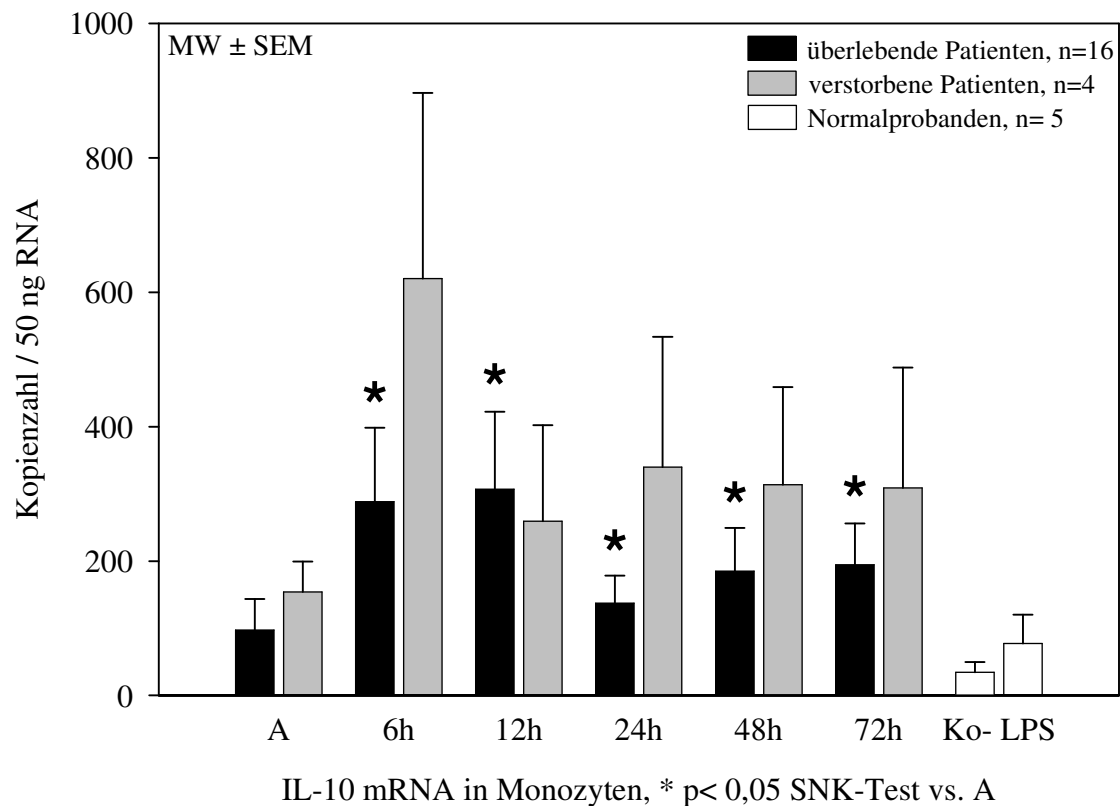


Abb. 8 zeigt die IL-10-mRNA-Expression in Monozyten polytraumatisierter Patienten unterteilt in Verstorbene (n=4) und Überlebende (n=16), sowie die der Normalprobanden nativ (Ko-) und LPS stimuliert (LPS). Innerhalb der Gruppe der Überlebenden sind 6 bis 72 Stunden nach Trauma signifikant höhere Werte im Vergleich zum initialen Zeitpunkt A bei Krankenhausaufnahme, zu sehen. Verstorbene hatten mit Ausnahme des Zwölfstundenwertes höhere Werte als Überlebende.

**Tab. 6:** IL-10-mRNA-Expression in Monozyten unterteilt nach dem Outcome in Überlebende und Verstorbene

MW±SEM	A	6h	12h	24h	48h	72h
überlebt: n=16	97 ± 46	288 ± 110 *	307 ± 115 *	137 ± 41 *	185 ± 64 *	195 ± 61 *
verstorben: n=4	154 ± 45	621 ± 276	259 ± 142	340 ± 193	314 ± 145	309 ± 179

\* p<0,05 im SNK-Test überlebt A vs. 6-72h



## **4.4.2 IL-10-mRNA-Expression in Granulozyten**

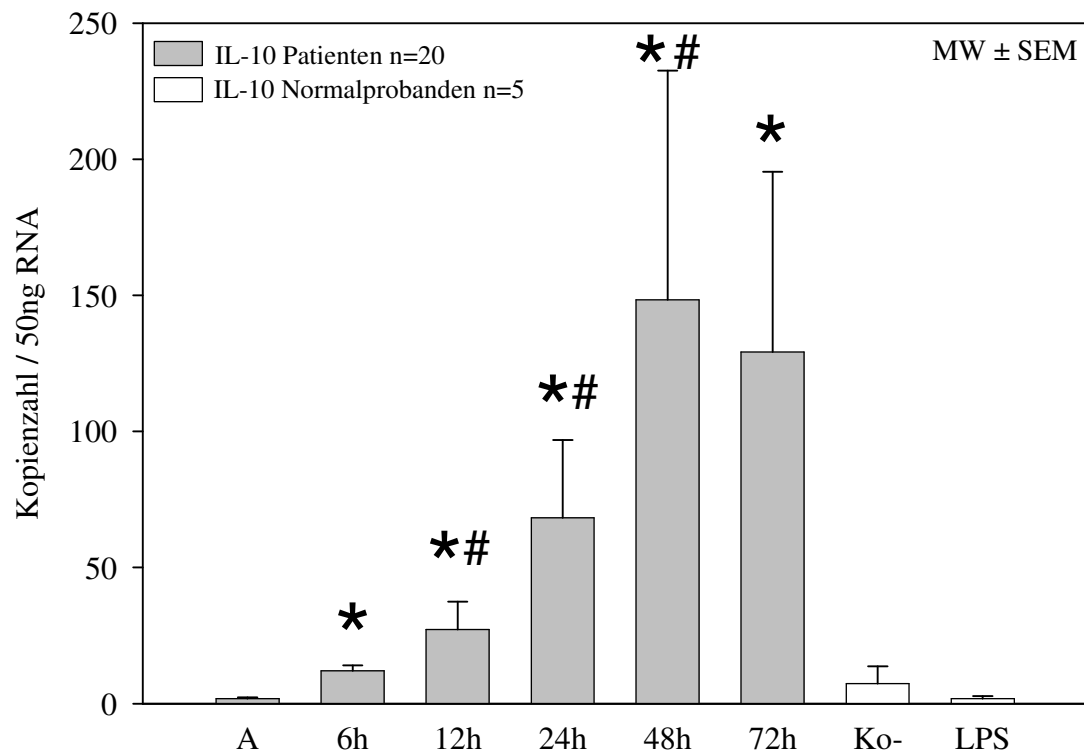
### **4.4.2.1 IL-10-mRNA-Expression in Granulozyten: Kontrollen**

Die IL-10-mRNA Expression in nativen Granulozyten der gesunden Probanden betrug  $7,4 \pm 6,2$  (MW $\pm$ SEM) pro 50ng eingesetzte RNA. Nach artifizieller Stimulation mit LPS fiel diese auf  $1,8 \pm 1,0$  (MW $\pm$ SEM) ab. Diese Ergebnisse sind in den folgenden Graphen als Negativkontrolle (Ko-) und LPS dargestellt.

### **4.4.2.2 IL-10-mRNA-Expression in Granulozyten: Gesamtkollektiv**

Die IL-10-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten steigt während des Beobachtungszeitraumes signifikant an. Die Werte der 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden-Messungen sind signifikant gegenüber denen der initialen Blutentnahme A erhöht ( $p < 0,05$  im Student-Newman-Keuls-Test). Ebenso sind die Werte 24, 48 und 72 Stunden nach Trauma gegenüber der nativen Kontrollgruppe erhöht ( $p < 0,045$  im Mann-Whitney-U-Test). Diese Ergebnisse sind in **Tab. 7** zusammengefasst und in **Abb. 9** graphisch dargestellt.

Abb. 9:



IL-10 mRNA in Granulozyten, \*  $p < 0,05$  SNK-Test vs. A, #  $p < 0,045$  U-Test vs. Ko-

Abb. 9 zeigt die IL-10-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten ( $n=20$ ), sowie die der Normalprobanden ( $n=5$ ) nativ (Ko-) und LPS stimuliert (Ko+). Die IL-10-mRNA-Expression steigt im Verlauf signifikant gegenüber dem initialen Wert A bei Krankenhausaufnahme an. Gegenüber der nativen Kontrollgruppe (Ko-) ist die IL-10-mRNA-Expression polytraumatisierter Patienten 12h, 24h und 48h signifikant erhöht.

Tab. 7: IL-10 mRNA-Expression in Granulozyten: Gesamtkollektiv

MW±SEM	A	6h	12h	24h	48h	72h
Patienten: n=20	1,88 ± 0,44	12,0 ± 2,04	27,2 ± 10,3	68,3 ± 28,6	148 ± 84,3	129 ± 66,3
		*	* #	* #	* #	*

\*  $p < 0,05$  im SNK-Test A vs. 6-72h; #  $p < 0,045$  im U-Test 12h, 24h, 48h vs. Ko-

#### **4.4.2.3 IL-10-mRNA-Expression in Granulozyten: Einteilung nach der Verletzungsschwere**

Die Unterteilung des Patientenkollektivs nach der Verletzungsschwere und dem damit verbundenen NISS in eine Gruppe mit mehr und eine Gruppe mit weniger als 41 NISS Punkten, zeigt innerhalb beider Gruppen eine signifikante Expressionssteigerung 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Trauma bezogen auf den initialen Wert A bei Krankenhausaufnahme ( $p < 0,05$  im Student-Newman-Keuls-Test). Des Weiteren ist die IL-10-mRNA-Expression der Patienten mit einem  $NISS < 41$  zum initialen Zeitpunkt A, 24, 48 und 72 Stunden nach Trauma signifikant höher als die der schwerer verletzten Patienten mit einem  $NISS \geq 41$  ( $p < 0,048$  im Mann-Whitney-U-Test). Die Messwerte sind in **Tab. 8** zusammengefasst und in **Abb. 10** graphisch dargestellt.

**Abb. 10:**

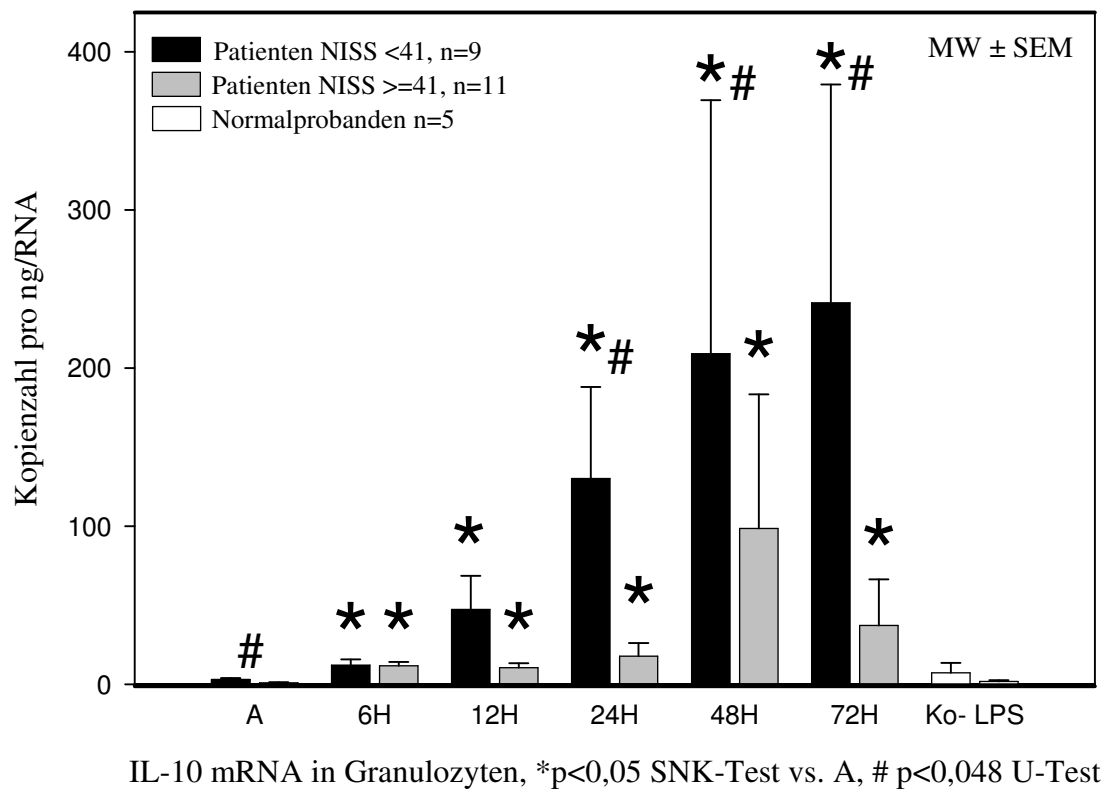


Abb. 10 zeigt die IL-10-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten unterteilt nach der Verletzungsschwere, sowie bei Normalprobanden nativ (Ko-) und LPS-stimuliert (LPS). Im Verlauf steigt die Expression in beiden Gruppen signifikant gegenüber dem initialen Wert A bei Krankenhausaufnahme an. Die IL-10-mRNA-Expression zum Zeitpunkt A, 24, 48 und 72 Stunden nach Trauma ist bei den schwerer verletzten Patienten signifikant niedriger als bei leichter Verletzten.

**Tab. 8:** IL-10 mRNA-Expression in Granulozyten unterteilt nach der Verletzungsschwere

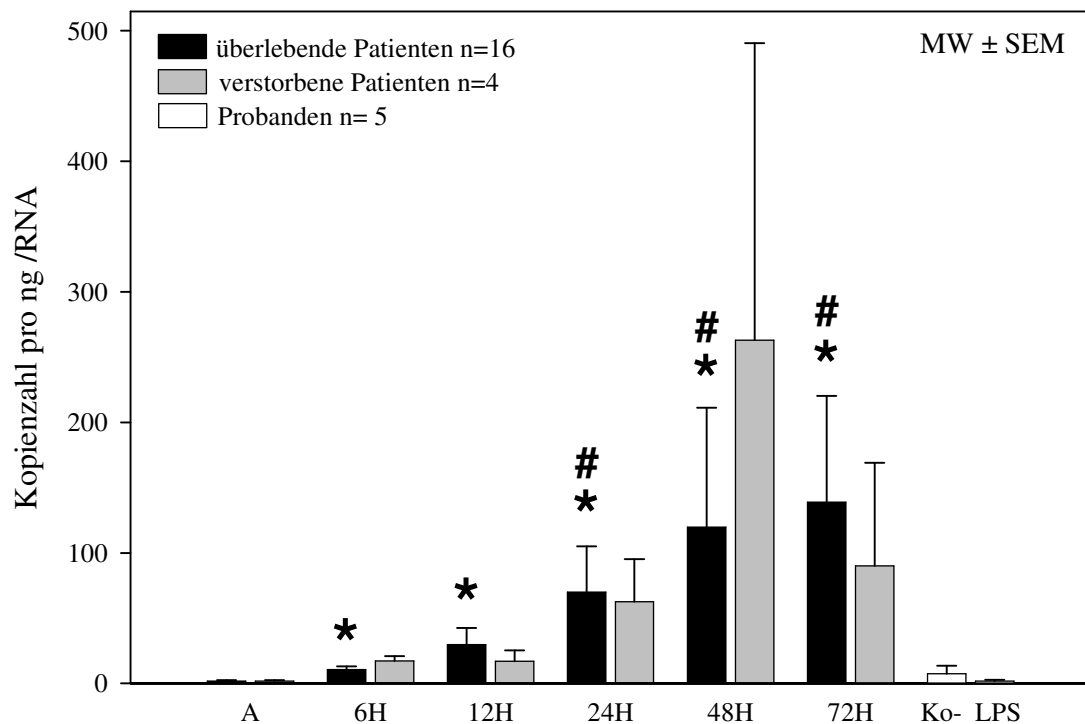
MW±SEM	A	6h	12h	24h	48h	72h
NISS < 4: n=9	3,02 ± 0,81	12,3 ± 3,56 *	47,4 ± 21,4 *	130,2 ± 57,8 *	209 ± 160 *	241 ± 138 *
NISS ≥ 41: n=11	0,95 ± 0,25 #	11,8 ± 2,46 *	10,6 ± 2,61 *	17,7 ± 8,46 * #	98,6 ± 84,8 * #	37,4 ± 29,0 * #

\* p<0,05 im SNK-Test A vs. 6-72h; # p<0,048 im U-Test NISS < 41 vs. NISS ≥ 41

#### **4.4.2.4 IL-10-mRNA-Expression in Granulozyten: Einteilung nach dem Outcome**

Die Einteilung des Patientenkollektivs nach dem klinischen Outcome in Überlebende und Verstorbene innerhalb von 90 Tagen nach Trauma ist in **Abb. 11** dargestellt. Die IL-10-Expression beider Gruppen steigt im Verlauf des Beobachtungszeitraumes an. In der Gruppe der Überlebenden ist der 6, 12, 24, 48 und 72-Stundenwert signifikant gegenüber dem initialen Wert A bei Klinikaufnahme erhöht (\* $p < 0,05$  im Student-Newman-Keuls-Test). In der Gruppe der Überlebenden ist die IL-10-mRNA-Expression 24, 48 und 72 Stunden nach Trauma signifikant gegenüber der nativen Kontrollgruppe (Ko-) erhöht ( $p < 0,04$  Mann-Whitney-U-Test). Die Messwerte sind in **Tab. 9** zusammengefasst.

**Abb. 11:**



IL-10 mRNA in Granulozyten, \*  $p < 0,05$  SNK-Test vs. A, #  $p = 0,04$  U-Test vs. Ko-

Abb. 11 zeigt die granulozytäre IL-10-mRNA-Expression polytraumatisierter Patienten, unterteilt nach dem klinischen Outcome in Überlebende ( $n=16$ ) und Verstorbene ( $n=4$ ) 90 Tage nach Trauma, sowie native (Ko-) und LPS stimulierte (LPS) Normalprobanden ( $n=5$ ). In beiden Gruppen steigt die Expression gegenüber dem initialen Wert bei Klinikaufnahme A an. In der Gruppe der Überlebenden ist die IL-10-Expression 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Trauma signifikant gegenüber dem Ausgangswert erhöht. Die Überlebenden zeigen im Vergleich zur nativen Kontrollgruppe 24, 48 und 72 Stunden nach Trauma eine signifikant erhöhte IL-10-mRNA-Expression.

**Tab. 9:** *IL-10-mRNA-Expression in Granulozyten unterteilt nach dem Outcome in Überlebende und Verstorbene*

MW±SEM	A	6h	12h	24h	48h	72h
überlebt: n=16	1,91 ± 0,52	10,7 ± 2,31 *	29,7 ± 12,7 *	69,8 ± 35,2 * #	119,7 ± 91,6 * #	139 ± 81,4 * #
verstorben: n=4	1,75 ± 0,88	17,2 ± 3,76	16,9 ± 8,50	62,4 ± 32,9	263 ± 227	90,1 ± 79,0

\* p<0,05 im SNK-Test A vs. 6-72h; # p<0,04 im U-Test überlebt 24h, 48h, 72h vs.Ko-

## **4.5 STAT3-mRNA-Expression in Monozyten und Granulozyten polytraumatisierter Patienten**

### **4.5.1 STAT3-mRNA-Expression in Monozyten**

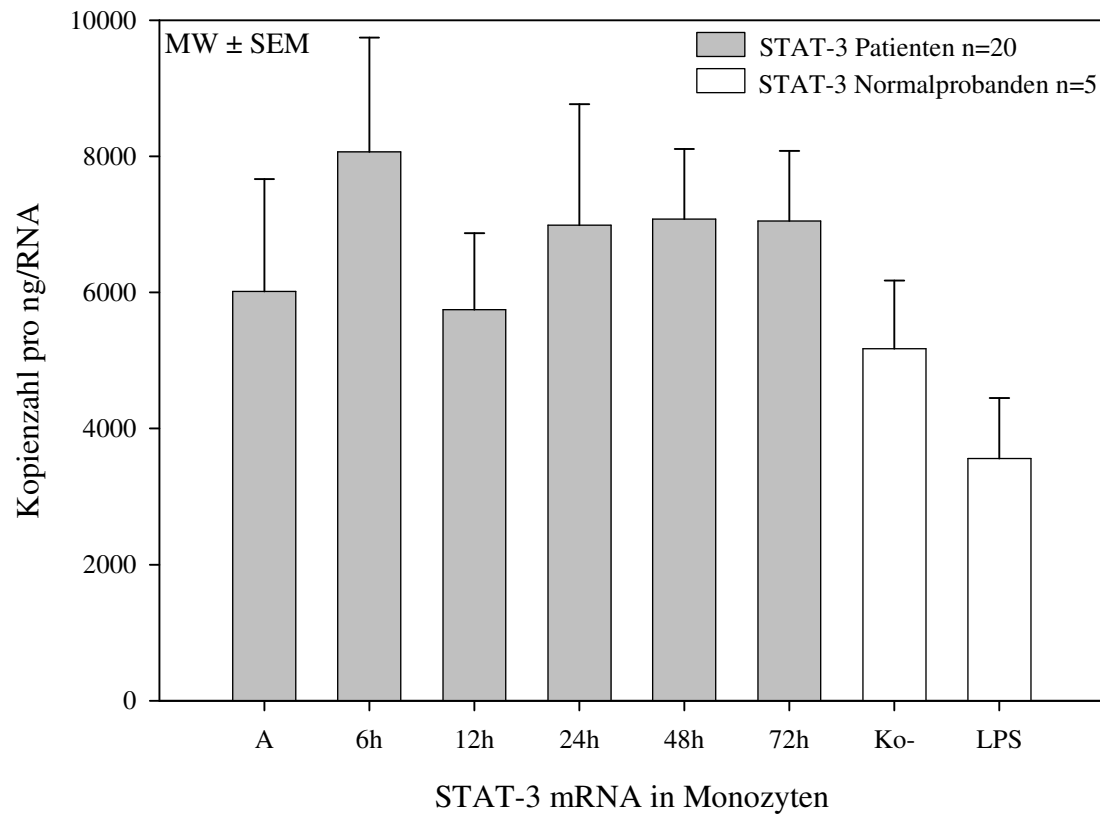
#### **4.5.1.1 STAT3-mRNA-Expression in Monozyten: Kontrollen**

Die STAT3-mRNA Expression in nativen Monozyten der gesunden Probanden betrug 5175±1000 (MW±SEM) pro 50ng eingesetzte RNA. Nach artifizieller Stimulation mit LPS fiel diese auf 3560±885 (MW±SEM) ab. Diese Ergebnisse sind in den folgenden Graphen als Negativkontrolle (Ko-) und LPS dargestellt.

#### **4.5.1.2 STAT3-mRNA-Expression in Monozyten polytraumatisierter Patienten: Gesamtkollektiv**

Die STAT3-mRNA-Expression in Monozyten ist in **Abb. 12** dargestellt. Das Expressionsmaximum lag bei 6 Stunden nach Trauma und fiel anschließend wieder leicht ab. Diese Unterschiede waren statistisch nicht signifikant. Die Werte sind in **Tab. 10** zusammengefasst.

**Abb. 12:**



*Abb. 12 zeigt die STAT3-mRNA-Expression in Monozyten. Das Expressionsmaximum liegt bei 6 Stunden nach Trauma und fällt im Anschluss wieder ab.*

**Tab. 10:** STAT3-mRNA-Expression in Monozyten, Gesamtkollektiv

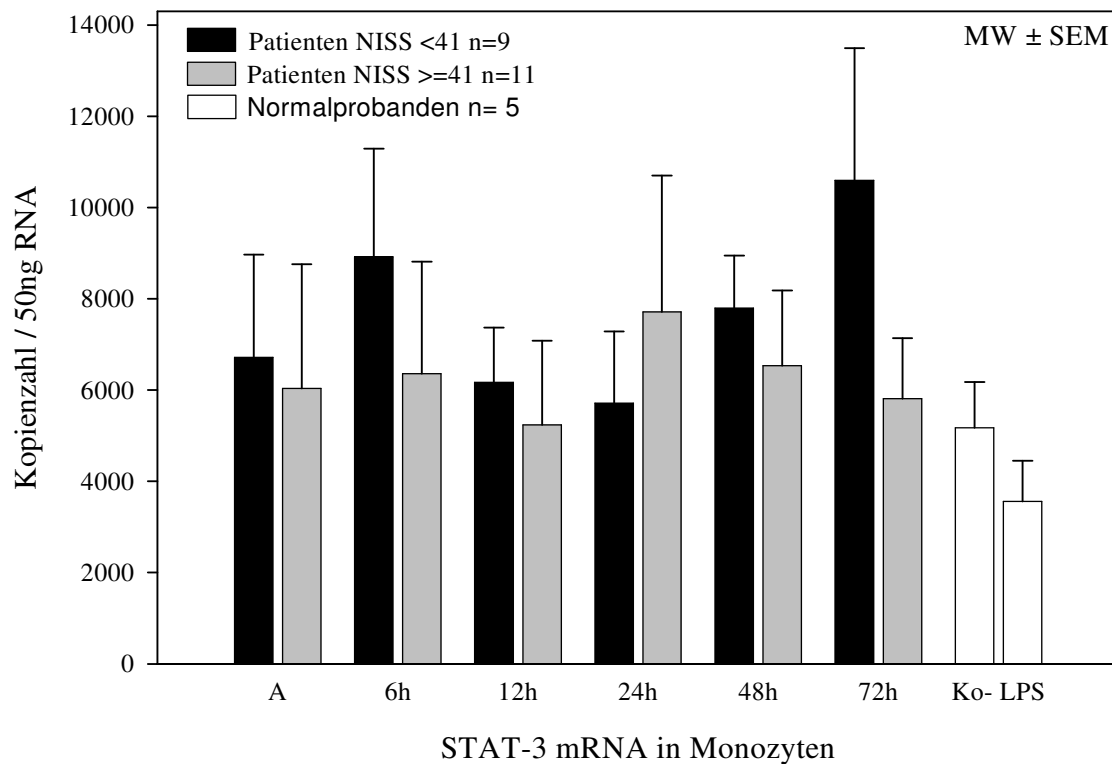
MW±SEM	A	6h	12h	24h	48h	72h
Patienten: n=20	6338 ± 1765	7511 ± 1703	5657 ± 1124	6815 ± 1761	7102 ± 1029	7965 ± 1549



### 4.5.1.3 STAT3-mRNA-Expression in Monozyten polytraumatisierter Patienten: Einteilung nach der Verletzungsschwere

Die Unterteilung der STAT3-mRNA-Expression anhand der Verletzungsschwere ist in **Abb.13** dargestellt. Es sind keine eindeutigen Unterschiede zu erkennen. Die Werte sind in **Tab. 11** zusammengefasst.

**Abb. 13:**



*Abb. 13 zeigt die STAT3-mRNA-Expression in Monozyten polytraumatisierter Patienten. Es sind keine eindeutigen Gruppenunterschiede zu erkennen.*

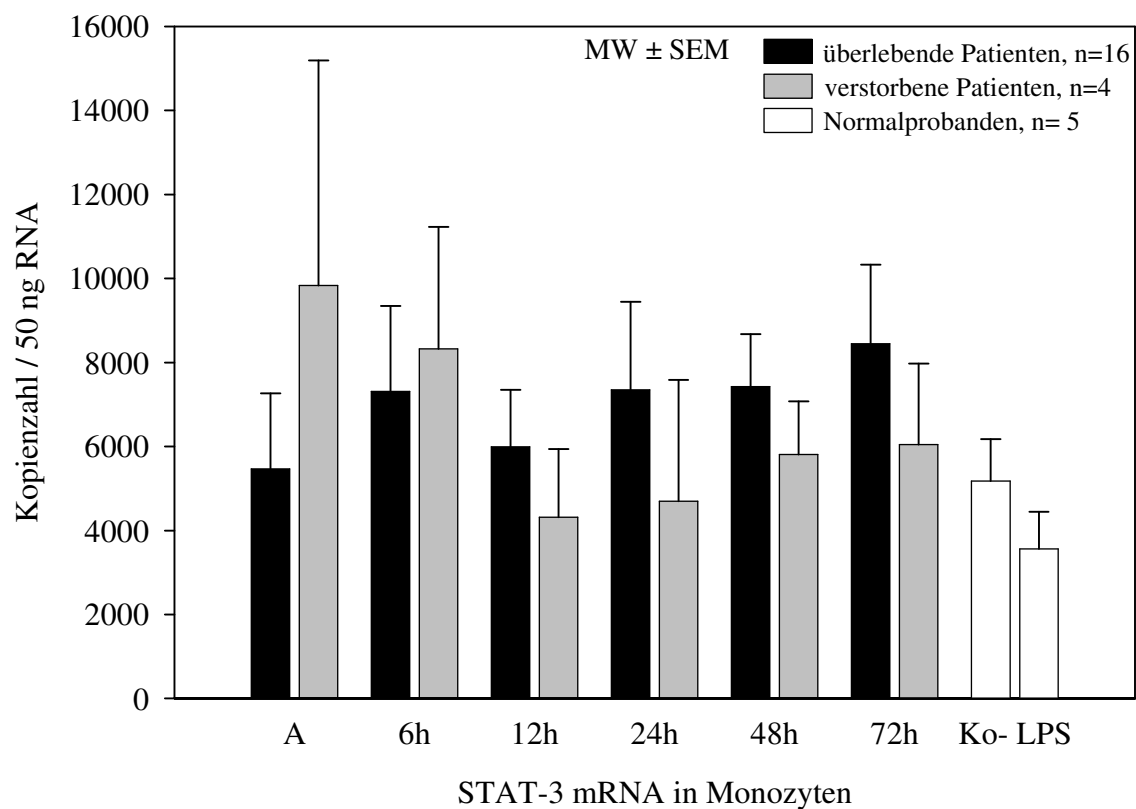
**Tab. 11:** STAT3-mRNA-Expression in Monozyten unterteilt nach der Verletzungsschwere

MW±SEM	A	6h	12h	24h	48h	72h
NISS < 4: n=9	6713 ± 2251	8923 ± 2368	6169 ± 1199	5714 ± 1573	7793 ± 1154	10598±2895
NISS ≥ 41:n=11	6031 ± 2725	6357 ± 2459	5238 ± 1840	7715 ± 2985	6537 ± 1648	5811 ± 1330

#### 4.5.1.4 STAT3-mRNA-Expression in Monozyten polytraumatisierter Patienten: Einteilung nach dem Outcome

In **Abb. 14** sind die STAT3-mRNA-Expressionswerte nach dem klinischen Outcome in Überlebende und Verstorbene innerhalb von 90 Tagen nach Trauma unterteilt. Zwischen den beiden Gruppen gibt es keine eindeutigen Unterschiede. In **Tab. 12** sind diese Werte zusammengefasst.

**Abb 14:**



*Abb. 14 zeigt die STAT3-mRNA-Expression in Monozyten polytraumatisierter Patienten unterteilt nach dem klinischen Outcome 90 Tage nach Trauma in Überlebende und Verstorbene. Es zeigten sich keine eindeutigen Unterschiede.*

**Tab. 12:** *STAT3-mRNA-Expression in Monozyten unterteilt nach dem Outcome in Überlebende und Verstorbene*

MW±SEM	A	6h	12h	24h	48h	72h
überlebt: n=16	5463 ± 1802	7309 ± 2038	5992 ± 1354	7344 ± 2097	7426 ± 1250	8446 ± 1880
verstorben: n=4	9837 ± 5352	8323 ± 2906	4317 ± 1619	4696 ± 2886	5806 ± 1264	6041 ± 1935

## 4.5.2 STAT3-mRNA-Expression in Granulozyten

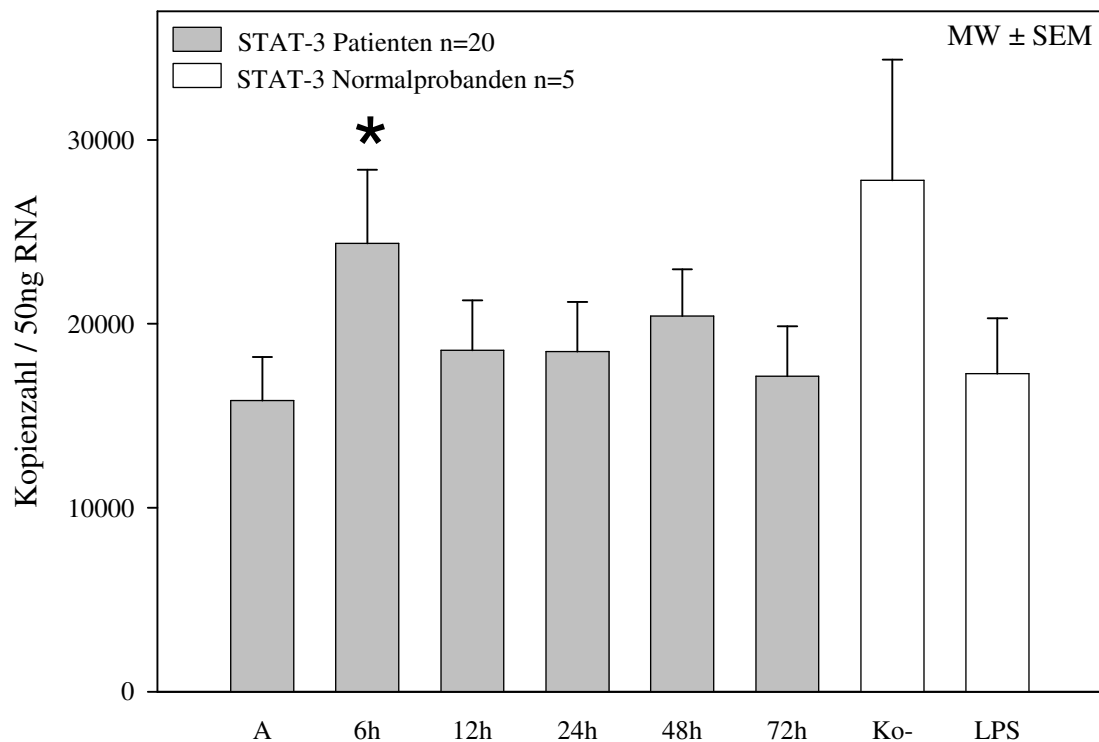
### 4.5.2.1 STAT3-mRNA-Expression in Granulozyten: Kontrollen

Die STAT3-mRNA Expression in nativen Granulozyten der gesunden Probanden betrug 27814±6559 (MW±SEM) pro 50ng eingesetzte RNA. Nach artifizieller Stimulation mit LPS fiel diese auf 17296±3012 (MW±SEM) ab. Diese Ergebnisse sind in den folgenden Graphen als Negativkontrolle (Ko-) und LPS dargestellt.

### 4.5.2.2 STAT3-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten: Gesamtkollektiv

Die STAT3-mRNA-Expression in Granulozyten zeigt ein Expressionsmaximum 6 Stunden nach Trauma, wie in **Abb. 15** dargestellt. Der initiale Wert A bei Klinikaufnahme sowie die Messwerte 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Trauma sind signifikant niedriger ( $p < 0,05$  im Student-Newman-Keuls-Test). Die Werte sind in **Tab. 13** zusammengefasst.

**Abb. 15:**



STAT-3 mRNA in Granulozyten, \*  $p < 0,05$  SNK-Test vs. A, 12h, 24h, 48h, 72h

Abb. 15 zeigt die STAT3-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten ( $n=20$ ) sowie gesunder Normalprobanden ( $n=5$ ). 6 Stunden nach erlittenem Polytrauma kommt es zu einer maximalen STAT3-mRNA-Expression. Dieser Wert ist gegenüber den anderen Messzeitpunkten signifikant erhöht.

**Tab. 13:** STAT- mRNA-Expression in Granulozyten: Gesamtkollektiv

MW±SEM	A	6h	12h	24h	48h	72h
Patienten: n=20	15832 ± 2380	24378 ± 4016	18567 ± 2719	18494 ± 2704	20422 ± 2548	17167 ± 2704
	*		*	*	*	*

\*  $p < 0,05$  im SNK-Test A, 12-72h vs. 6h

#### **4.5.2.3 STAT3-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten: Einteilung nach der Verletzungsschwere**

Die STAT3-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten unterteilt nach der Verletzungsschwere in eine Gruppe mit einem NISS von weniger als 41 Punkten und in eine Gruppe mit einem NISS von 41 Punkten und mehr, ergibt bei den schwerer verletzten Patienten eine niedrigere STAT3-Expression zu allen Abnahmezeitpunkten, wie in **Abb. 16** dargestellt. In beiden Gruppen liegt das Expressionsmaximum bei 6 Stunden nach Trauma. Diese Ergebnisse waren nicht statistisch signifikant. Die Werte sind in **Tab. 14** zusammengefasst.

**Abb. 16:**

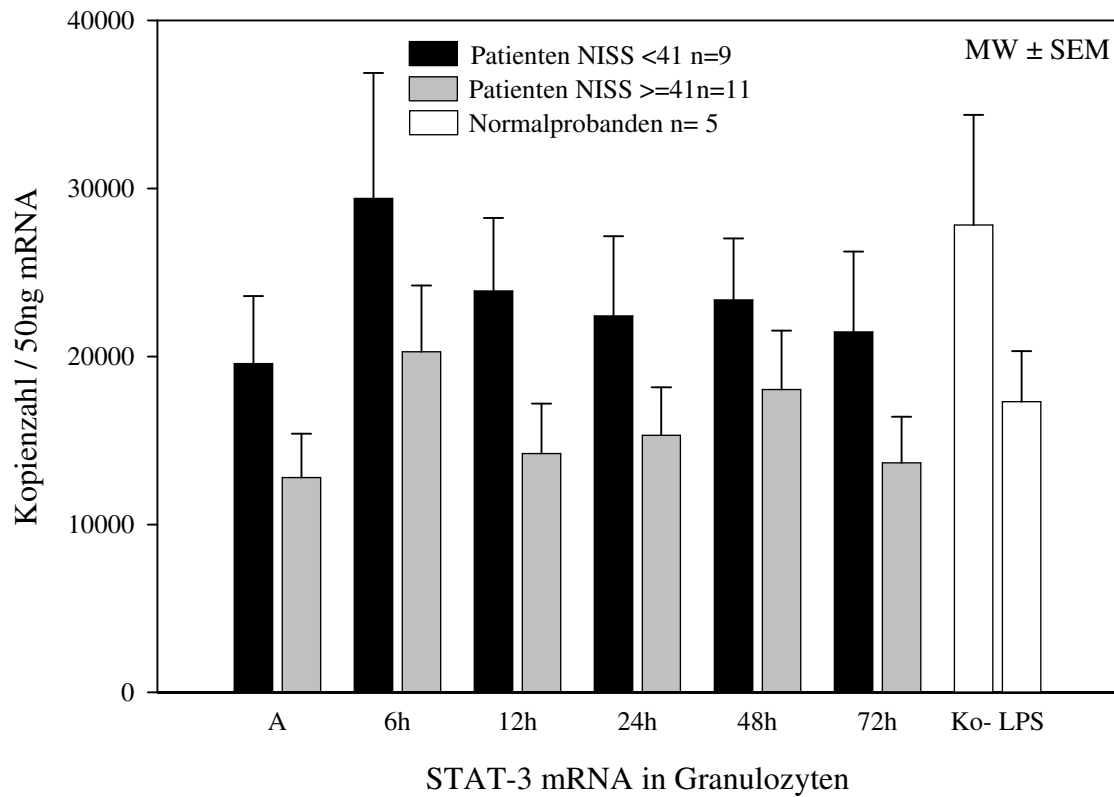


Abb. 16 zeigt die STAT3-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten unterteilt nach der Verletzungsschwere, sowie von gesunden Normalprobanden (n=5) nativ (Ko-) und LPS stimuliert (LPS). Schwerer verletzte Patienten haben zu allen Abnahmezeitpunkten eine niedrigere STAT3-mRNA-Expression als die leichter verletzten Patienten.

**Tab. 14:** STAT3-mRNA-Expression in Granulozyten unterteilt nach der Verletzungsschwere

MW±SEM	A	6h	12h	24h	48h	72h
NISS < 4:	19555 ±	29396 ±	23891 ±	22403 ±	23367 ±	21455 ±
n=9	4042	7466	4360	4757	3640	4781
NISS ≥ 41:	12786 ±	20274 ±	14210 ±	15295 ±	2860 ±	13659 ±
n=11	2609	3933	2981	2860	3529	2749

#### **4.5.2.4 STAT3-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten: Einteilung nach dem Outcome**

Eine Unterteilung des Patientenkollektivs nach dem klinischen Outcome innerhalb von 90 Tagen nach Trauma in Überlebende und Verstorbene ergibt initial bei Klinikaufnahme eine niedrigere STAT3-mRNA-Expression in der Gruppe der Verstorbenen, wie in **Abb. 17** dargestellt. Im weiteren Verlauf ist die Expression im Vergleich zur Gruppe der Überlebenden erhöht. Beide Gruppen haben ihr Expressionsmaximum 6 Stunden nach Trauma. Diese Unterschiede waren statistisch nicht signifikant. Die Messwerte sind in **Tab. 15** zusammengefasst.

**Abb. 17:**

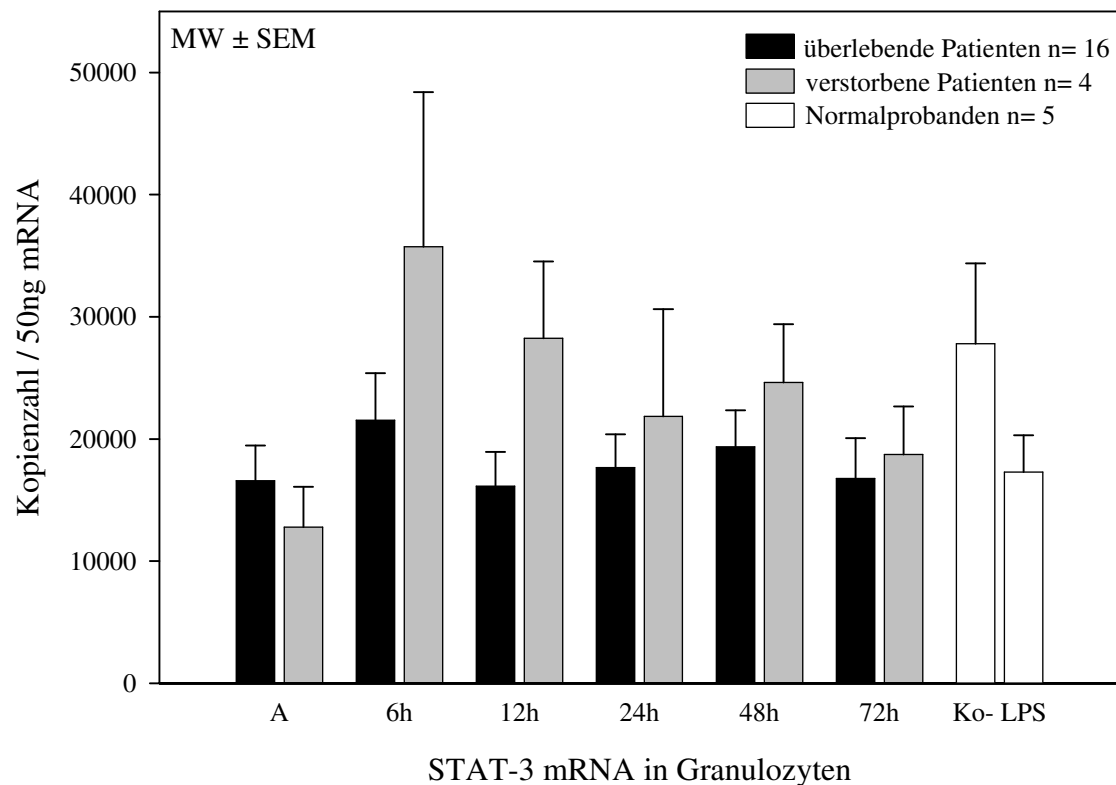


Abb. 17 zeigt die STAT3-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten unterteilt nach dem klinischen Outcome innerhalb von 90 Tagen nach Trauma in Überlebende (n=16) und Verstorbene (n=4), sowie von gesunden Normalprobanden (n=5) nativ (Ko-) und LPS stimuliert (LPS). Zum initialen Zeitpunkt A bei Klinikaufnahme ist die Expression der Verstorbenen niedriger als die der Überlebenden. Im weiteren Verlauf ist die Expression zu den Zeitpunkten 6-72 Stunden höher als bei den Überlebenden.

**Tab. 15:** STAT3-mRNA-Expression in Granulozyten unterteilt nach dem Outcome in Überlebende und Verstorbene

MW±SEM	A	6h	12h	24h	48h	72h
überlebt: n=16	16593 ± 2868	21538 ± 3855	16152 ± 2788	17654 ± 2736	19374 ± 2961	16777 ± 3279
verstorben: n=4	12788 ± 3308	35740 ± 1263	28225 ± 6310	21853 ± 8783	24615 ± 4783	18728 ± 3935



## **4.6 SOCS1-mRNA-Expression in Monozyten und Granulozyten polytraumatisierter Patienten**

### **4.6.1 SOCS1-mRNA-Expression in Monozyten**

#### **4.6.1.1 SOCS1-mRNA-Expression in Monozyten: Kontrollen**

Die SOCS1-mRNA Expression in nativen Monozyten der gesunden Probanden betrug  $61 \pm 5,0$  (MW $\pm$ SEM) pro 50ng eingesetzte RNA. Nach artifizieller Stimulation mit LPS stieg diese signifikant auf  $3147 \pm 203$  (MW $\pm$ SEM) an ( $p < 0,016$  im U-Test). Diese Ergebnisse sind in den folgenden Graphen als Negativkontrolle (Ko-) und LPS dargestellt.

#### **4.6.1.2 SOCS1-mRNA-Expression in Monozyten polytraumatisierter Patienten: Gesamtkollektiv**

In **Abb. 18** ist die Expression der SOCS1-mRNA in Monozyten dargestellt. Die Werte zeigten initial zum Zeitpunkt A die höchste Expression, die im weiteren Verlauf leicht abfällt. Diese Ergebnisse sind statistisch nicht signifikant. Die SOCS1-mRNA-Expression der LPS stimulierten Kontrollgruppe ist gegenüber der nativen Kontrollgruppe signifikant erhöht ( $p < 0,008$  im Mann-Whitney-U-Test). Die Werte sind in **Tab. 16** zusammengefasst.

**Abb. 18:**

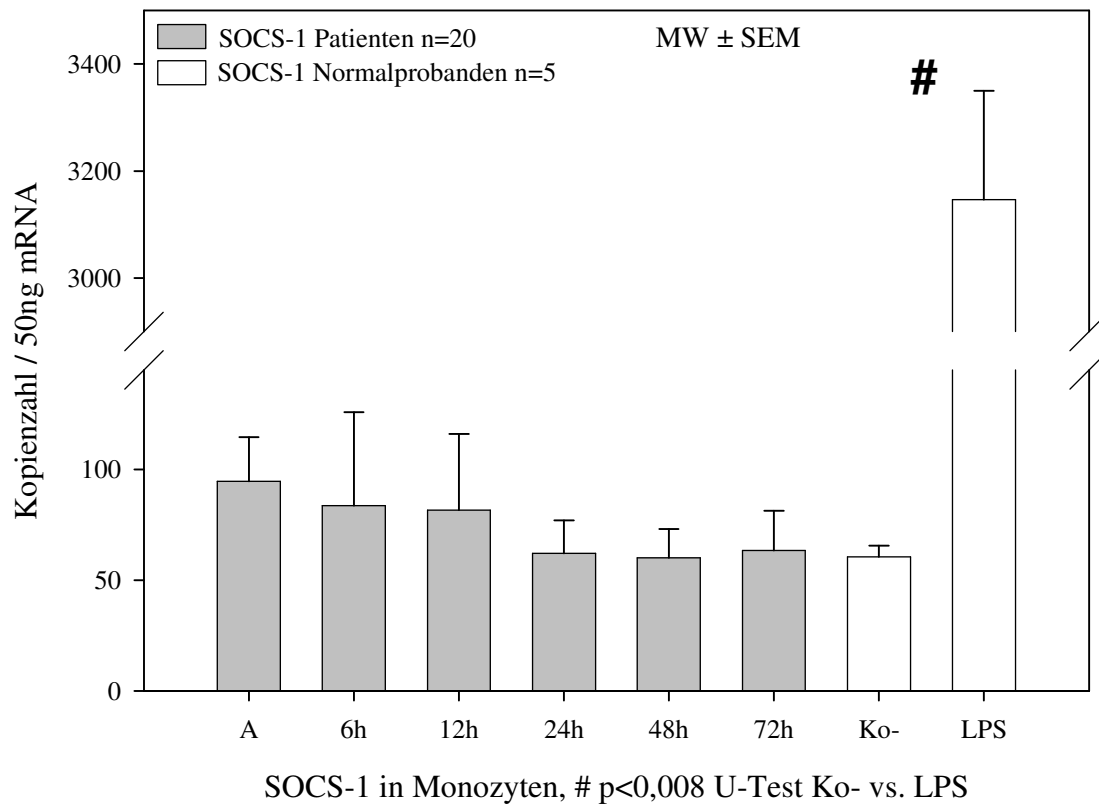


Abb. 18 zeigt die mRNA-Expression von *SOCS1* in Monozyten polytraumatisierter Patienten (n=20) und von Normalprobanden (n=5) nativ (Ko-) und LPS-stimuliert (LPS). Die mRNA-Expression ist zum initialen Zeitpunkt A bei Klinikaufnahme am höchsten und fällt während des Beobachtungszeitraumes leicht ab. Die Expression der LPS-stimulierten Kontrollgruppe ist gegenüber der nativen Kontrollgruppe signifikant erhöht.

**Tab. 16:** SOCS-mRNA-Expression in Monozyten: Gesamtkollektiv

MW±SEM	A	6h	12h	24h	48h	72h
Patienten: n=20	94,7 ± 20,1	83,7 ± 42,2	81,6 ± 34,5	62,1 ± 15,0	60,1 ± 13,0	63,4 ± 18,0

#### **4.6.1.3 SOCS1-mRNA-Expression in Monozyten polytraumatisierter Patienten: Einteilung nach der Verletzungsschwere**

Die Einteilung des Patientenkollektivs nach der Verletzungsschwere und dem damit verbundenen NISS in eine Gruppe mit weniger als 41 NISS-Punkten und eine Gruppe mit 41 NISS-Punkten und mehr ist in **Abb. 19** dargestellt. Es zeigt sich eine niedrigere SOCS1-mRNA-Expression der schwerer verletzten Patienten. Die Expression sinkt bis zum Zeitpunkt 6 Stunden nach Trauma und steigt im weiteren Beobachtungszeitraum wieder auf etwa den Ausgangswert an. In der Gruppe der leichter Verletzten steigt die SOCS1-Expression bis zum Sechsstundenzeitpunkt an und sinkt im Anschluss unter das Niveau des initialen Wertes A bei Klinikaufnahme. Diese Werte waren nicht signifikant. Die SOCS1-Expressionswerte in LPS-stimulierten Monozyten von Normalprobanden waren signifikant höher als die der nativen Kontrollgruppe ( $p < 0,008$  im Mann-Whitney-U-Test). Die Werte sind in **Tab. 17** zusammengefasst.

**Abb. 19:**

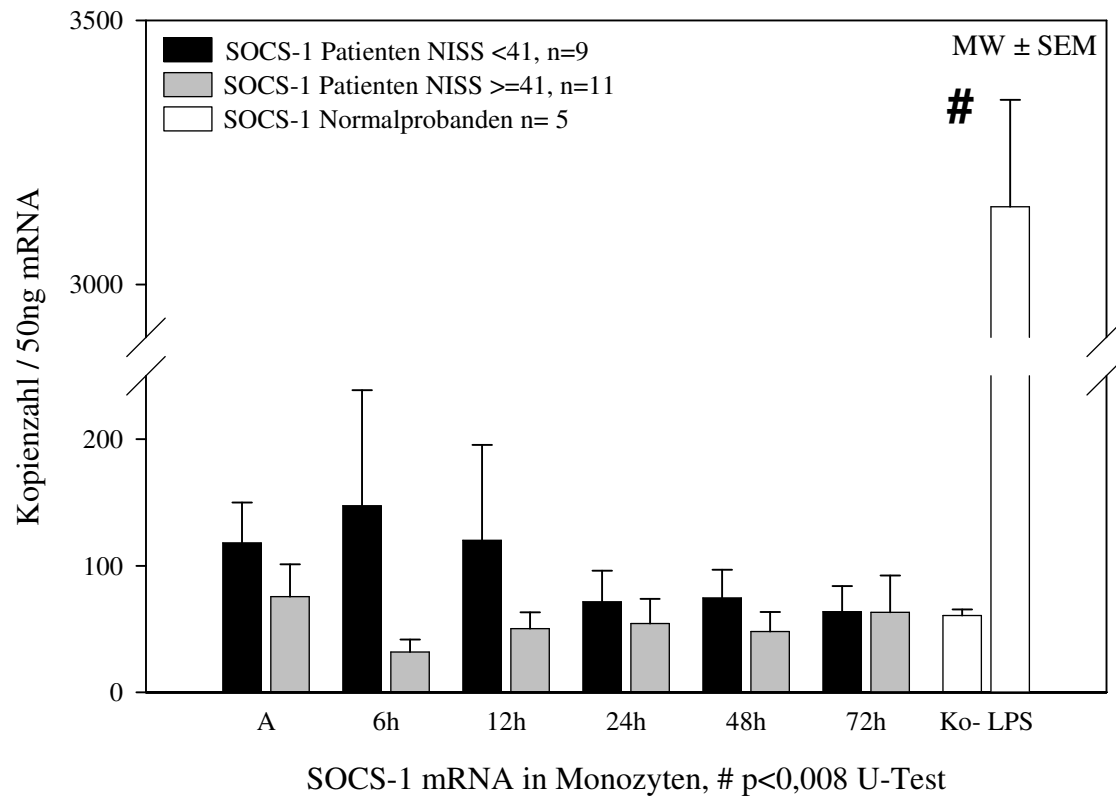


Abb. 19 zeigt die mRNA-Expression von *SOCS1* in Monozyten polytraumatisierter Patienten unterteilt nach der Verletzungsschwere und dem damit verbundenen NISS, sowie von Probanden (n=5) nativ (Ko-) und LPS-stimuliert (LPS). Es zeigt sich eine niedrigere *SOCS1*-mRNA-Expression der schwerer Verletzten im Vergleich zu den leichter Verletzten. Das Expressionsmaximum der schwerer Verletzten liegt, wie das Expressionsminimum der leichter Verletzten, jeweils beim Sechsstundenwert. Die Expression der LPS-stimulierten Kontrollgruppe ist gegenüber der nativen Kontrollgruppe signifikant erhöht.

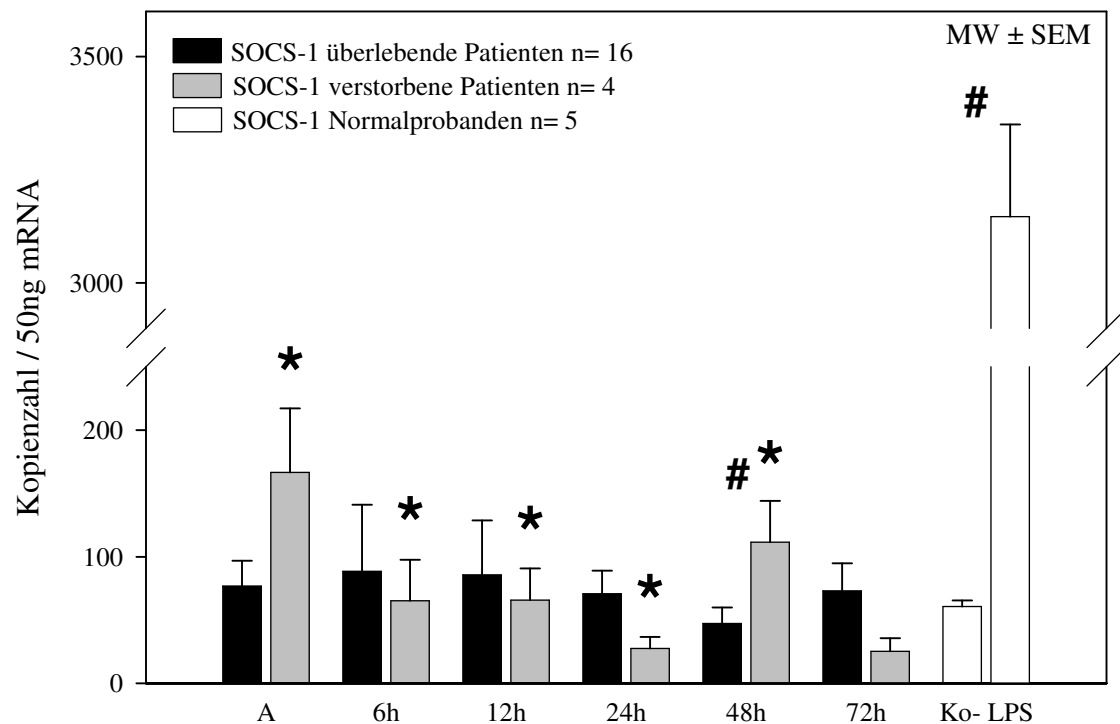
**Tab. 17:** *SOCS1-mRNA-Expression in Monozyten unterteilt nach der Verletzungsschwere*

MW±SEM	A	6h	12h	24h	48h	72h
NISS < 4: n=9	117,9 ± 31,8	147,2 ± 91,4	120,0 ± 75,4	71,6 ± 24,4	74,7 ± 22,2	63,6 ± 20,4
NISS ≥ 41: n=11	75,7 ± 25,4	31,8 ± 9,8	50,2 ± 13,0	54,3 ± 19,4	48,1 ± 15,2	63,3 ± 29,0

#### **4.6.1.4 SOCS1-mRNA-Expression in Monozyten polytraumatisierter Patienten: Einteilung nach dem Outcome**

Die Unterteilung des Patientenkollektivs nach dem klinischen Outcome 90 Tage nach Trauma in Patienten, die das Trauma überlebten und Patienten, die verstarben, ist in **Abb. 20** dargestellt. Innerhalb der Gruppe der Verstorbenen besteht initial zum Zeitpunkt A bei Klinikaufnahme die höchste SOCS1-Expression, die bis 24 Stunden nach Trauma abfällt. 48 Stunden nach Trauma besteht eine erneute Zunahme der Expression, 72 Stunden nach Trauma kommt es zu einem erneuten Expressionsrückgang. Die SOCS1-Expression 72 Stunden nach Trauma ist in der Gruppe der Verstorbenen signifikant niedriger als zu den Messzeitpunkten A bis 48 Stunden ( $p < 0,05$  im Student-Newman-Keuls-Test). Die Expression 48 Stunden nach Trauma ist im Vergleich zu den Überlebenden signifikant höher ( $p = 0,033$  im Mann-Whitney-U-Test). In der Gruppe der Überlebenden bestehen keine eindeutigen Unterschiede der Expression während des Beobachtungszeitraumes. Die Werte sind in **Tab. 18** zusammengefasst.

**Abb. 20:**



SOCS-1 mRNA in Monozyten, \*  $p < 0,05$  SNK-Test vs. 72h, #  $p < 0,033$  U-Test.

Abb. 20 zeigt die mRNA-Expression von SOCS1 in Monozyten polytraumatisierter Patienten unterteilt nach dem klinischem Outcome 90 Tage nach Trauma in Verstorbene ( $n=4$ ) und Überlebende ( $n=16$ ), sowie von Normalprobanden ( $n=5$ ) nativ (Ko-) und LPS.stimuliert (LPS). Die SOCS1-Expression 72 Stunden nach Trauma ist in der Gruppe der Verstorbenen signifikant niedriger als zu den übrigen Messzeitpunkten. Die Expression 48 Stunden nach Trauma ist im Vergleich zu den Überlebenden signifikant höher. Die Expression der LPS-stimulierten Kontrollgruppe ist gegenüber der nativen Kontrollgruppe signifikant erhöht.

**Tab. 18:** SOCS1-mRNA-Expression in Monozyten unterteilt nach dem Outcome in Überlebende und Verstorbene

MW±SEM	A	6h	12h	24h	48h	72h
überlebt: n=16	76,7 ± 20,1	88,4 ± 52,6	85,6 ± 42,9	70,7 ± 18,1	47,2 ± 12,7	73,0 ± 21,8
verstorben: n=4	166,5 ± 50,3 *	65,1 ± 32,5 *	65,7 ± 25,0 *	27,5 ± 9,2 *	111,5 ± 32,6 * #	25,2 ± 10,6

\* p<0,05 im SNK-Test verstorben 72h vs. A-48h; # p<0,033 im U-Test überlebt vs. verstorben

## 4.6.2 SOCS1-mRNA-Expression in Granulozyten

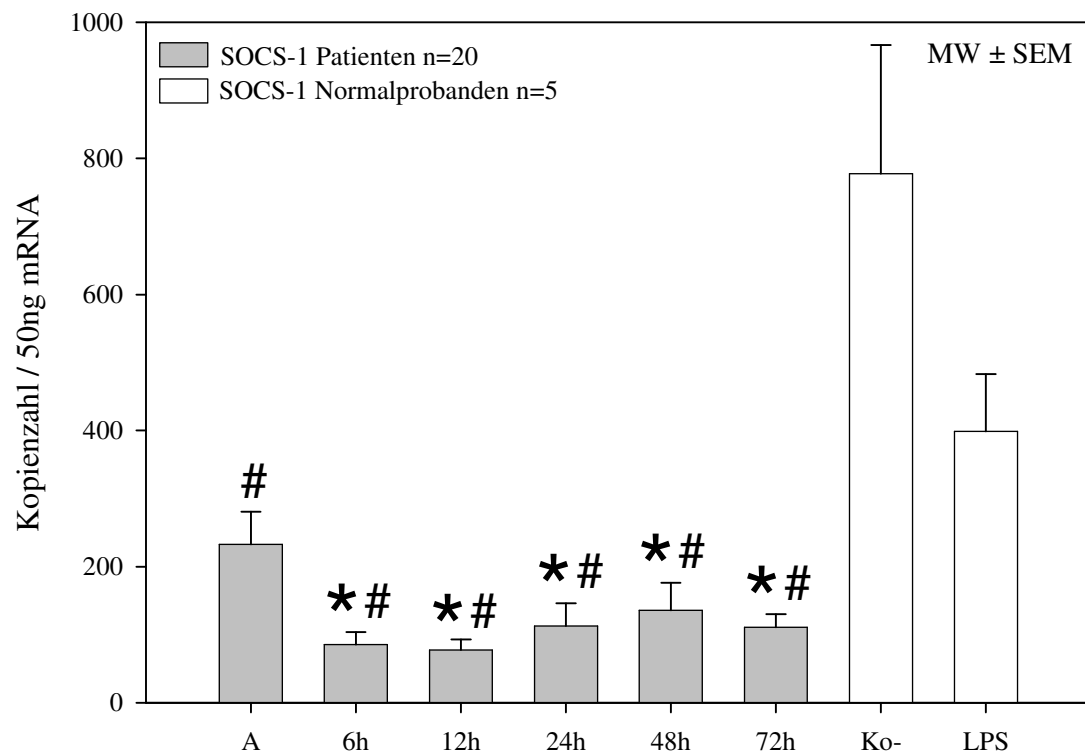
### 4.6.2.1 SOCS1-mRNA-Expression in Granulozyten: Kontrollen

Die SOCS1-mRNA-Expression in nativen Granulozyten der gesunden Probanden betrug 778±187 (MW±SEM) pro 50ng eingesetzter RNA. Nach artifizieller Stimulation mit LPS fiel diese auf 399±84 (MW±SEM) ab. Diese Ergebnisse sind in den folgenden Graphen als Negativkontrolle (Ko-) und LPS dargestellt..

### 4.6.2.2 SOCS1-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten: Gesamtkollektiv

In **Abb. 21** sind die Ergebnisse der SOCS1-mRNA-Messungen in Granulozyten polytraumatisierter Patienten und von Normalprobanden nativ und LPS-stimuliert dargestellt. Die initiale Expression zum Zeitpunkt A bei Klinikaufnahme war signifikant gegenüber den darauffolgenden Zeitpunkten 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden erhöht (p<0,05 im Student-Newmann-Keuls-Test). Des Weiteren war die Expression aller Messzeitpunkte signifikant niedriger als die der gesunden Kontrollgruppe (p<0,004 im Mann-Whitney-U-Test). Die Werte sind in **Tab. 19** zusammengefasst.

**Abb. 21:**



SOCS-1 mRNA in Grnulozyten, \* p<0,05 SNK-Test vs. A, # p<0,004 U-Test vs. Ko-

Abb. 21 zeigt die SOCS1-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten (n=20) und von Normalprobanden (n=5) nativ (Ko-) und LPS-stimuliert (LPS). Die initiale Expression zu Zeitpunkt A bei Klinikaufnahme war signifikant gegenüber den darauffolgenden Zeitpunkten 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden erhöht. Die SOCS1-Expression der Patienten war zu allen Messzeitpunkten signifikant niedriger als die der gesunden Kontrollgruppe.

**Tab. 19:** SOCS1-mRNA-Expression in Granulozyten: Gesamtkollektiv

MW±SEM	A	6h	12h	24h	48h	72h
Patienten: n=20	232,5 ± 48,2 #	85,8 ± 17,9 * #	77,5 ± 15,5 * #	112,6 ± 33,7 * #	135,7 ± 40,6 * #	111,1 ± 19,0 * #

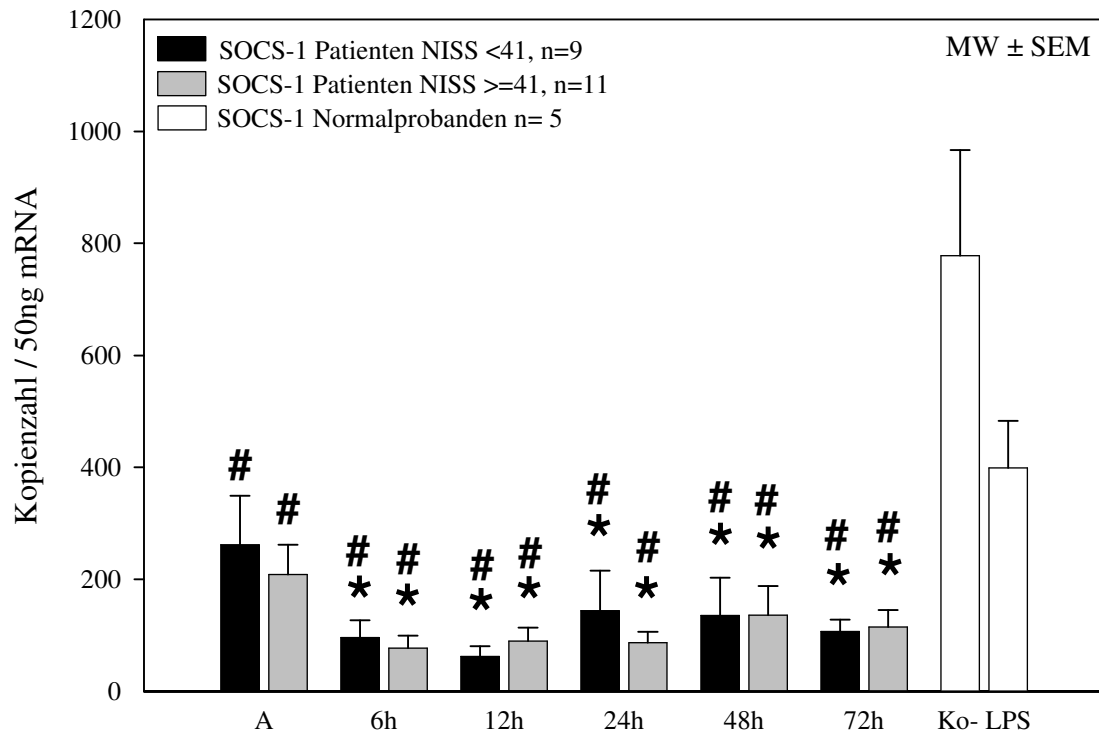
\* p<0,05 im SNK-Test A vs. 6-72h; # p<0,004 im U-Test A-72h vs. Ko-



#### **4.6.2.3 SOCS1-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten: Einteilung nach der Verletzungsschwere**

Die SOCS1-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten unterteilt nach der Verletzungsschwere und dem damit verbundenen NIS-Score in eine Gruppe mit weniger als 41 NISS Punkten und eine Gruppe mit 41 oder mehr NISS-Punkten, sowie von Normalprobanden nativ und LPS-stimuliert sind in **Abb. 22** dargestellt. In beiden Gruppen war die initiale Expression zum Zeitpunkt A bei Klinikaufnahme signifikant gegenüber den darauffolgenden Zeitpunkten 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden erhöht ( $p < 0,05$  im Student-Newmann-Keuls-Test). Des Weiteren war innerhalb beider Gruppen die SOCS1-mRNA-Expression aller Messzeitpunkte signifikant niedriger als die der gesunden Kontrollgruppe ( $p < 0,016$  im Mann-Whitney-U-Test). Zwischen leichter und schwerer Verletzten bestanden keine eindeutigen Unterschiede. Die Werte sind in **Tab. 20** zusammengefasst.

Abb. 22:



SOCS-1 mRNA in Granulozyten, \*  $p < 0,05$  SNK-Test vs. A, #  $p < 0,016$ , U-Test vs. Ko-

Abb. 22 zeigt die SOCS1-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten unterteilt nach der Verletzungsschwere, sowie von Normalprobanden ( $n=5$ ) nativ (Ko-) und LPS-stimuliert (LPS). In beiden Gruppen war die initiale Expression zum Zeitpunkt A bei Klinikaufnahme signifikant gegenüber den darauffolgenden Zeitpunkten erhöht. Die SOCS1-Expression der Patienten war in beiden Gruppen zu allen Messzeitpunkten signifikant niedriger als die der gesunden Kontrollgruppe.

Tab. 20: SOCS1-mRNA-Expression in Granulozyten unterteilt nach der Verletzungsschwere

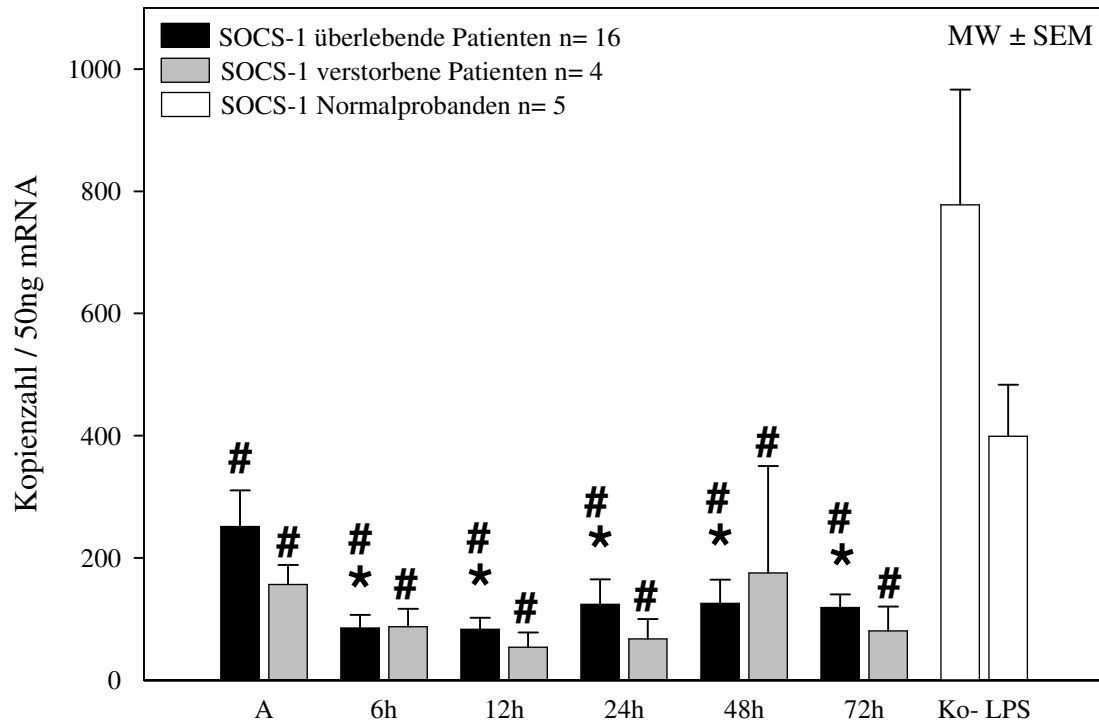
MW±SEM	A	6h	12h	24h	48h	72h
NISS < 4: n=9	262,0 ± 87,4 #	96,2 ± 30,3 * #	62,3 ± 18,3 * #	143,9 ± 72,0 * #	135,5 ± 67,3 * #	106,9 ± 21,1 * #
NISS ≥ 41:n=11	208,5 ± 53,8 #	77,2 ± 22,0 * #	89,9 ± 24,1 * #	87,1 ± 19,5 * #	135,9 ± 52,2 * #	114,5 ± 30,8 * #

\*  $p < 0,05$  im SNK-Test A vs. 6-72h; #  $p < 0,016$  im U-Test A-72h vs. Ko-

#### **4.6.2.4 SOCS1-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten: Einteilung nach dem Outcome**

Die Unterteilung des Patientenkollektivs nach dem klinischen Outcome 90 Tage nach Trauma in Patienten, die das Trauma überlebten und Patienten, die verstarben ist in **Abb. 23** dargestellt. Innerhalb der Gruppe der Verstorbenen fällt nach dem initialen Zeitpunkt A bei Klinikaufnahme die SOCS1-Expression bis 24 Stunden nach Trauma ab. 48 Stunden nach Trauma besteht eine erneute Expressionszunahme, 72 Stunden nach Trauma kommt es zu einem erneuten Rückgang. In der Gruppe der Überlebenden besteht zum Zeitpunkt A bei Klinikaufnahme die höchste Expression, im übrigen Beobachtungszeitraum 6 bis 72 Stunden sind die Expressionswerte signifikant niedriger. Im Student-Newman-Keuls-Test besteht eine Signifikanz von  $p < 0,05$ . In beiden Gruppen ist die SOCS1-Expression zu allen Messzeitpunkten signifikant niedriger als die der gesunden Kontrollgruppe. Im Mann-Whitney-U-Test besteht eine Signifikanz von  $p = 0,016$ . Die Werte sind in **Tab. 21** zusammengefasst.

**Abb. 23:**



SOCS-1 mRNA in Granulozyten, \* p<0,05 SNK-Test, vs. A, # p<0,016 U-Test vs. Ko-

Abb. 23 zeigt die mRNA-Expression von SOCS1 in Granulozyten polytraumatisierter Patienten unterteilt nach dem klinischem Outcome 90 Tage nach Trauma in Verstorbene (n=4) und Überlebende (n=16), sowie Normalprobanden (n=5) nativ (Ko-) und LPS-stimuliert (LPS). In der Gruppe der Überlebenden besteht zum Zeitpunkt A bei Klinikaufnahme die signifikant höchste Expression. In beiden Gruppen ist die SOCS1-Expression zu allen Messzeitpunkten signifikant niedriger als die der gesunden Kontrollgruppe (Ko-)

**Tab. 21:** SOCS1-mRNA-Expression in Granulozyten unterteilt nach dem Outcome in Überlebende und Verstorbene

MW±SEM	A	6h	12h	24h	48h	72h
überlebt: n=16	251,6 ± 59,2 #	85,4 ± 21,5 * #	83,4 ± 18,5 * #	123,9 ± 41,2 * #	125,9 ± 38,6 * #	118,7 ± 21,7 * #
verstorben: n=4	156,8 ± 31,7 #	87,3 ± 29,3 #	53,8 ± 24,4 #	67,6 ± 32,3 #	175,2 ± 147,4 #	80,7 ± 39,5 #

\* p<0,05 im SNK-Test A vs. 6-72h; # p<0,016 im U-Test A-72h vs. Ko-

## **4.7 SOCS3-mRNA-Expression in Monozyten und Granulozyten polytraumatisierter Patienten**

### **4.7.1 SOCS3-mRNA-Expression in Monozyten**

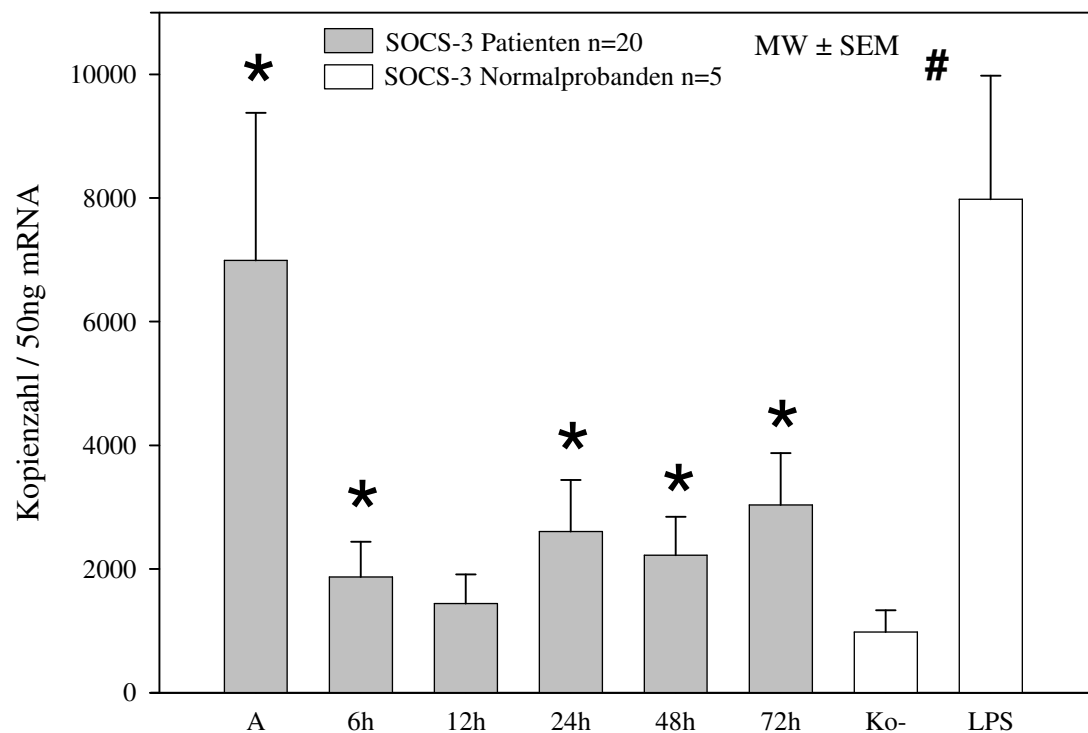
#### **4.7.1.1 SOCS3-mRNA-Expression in Monozyten: Kontrollen**

Die SOCS3-mRNA Expression in nativen Monozyten der gesunden Probanden betrug  $980 \pm 353$  (MW $\pm$ SEM) pro 50ng eingesetzter RNA. Nach artifizieller Stimulation mit LPS stieg diese signifikant auf  $7981 \pm 1993$  (MW $\pm$ SEM) an ( $p < 0,016$  im U-Test). Diese Ergebnisse sind in den folgenden Graphen als Negativkontrolle (Ko-) und LPS dargestellt.

#### **4.7.1.2 SOCS3-mRNA-Expression in Monozyten polytraumatisierter Patienten: Gesamtkollektiv**

Die mRNA-Expression von SOCS3 in Monozyten ist in **Abb. 24** dargestellt. Das Expressionsmaximum liegt im initialen Wert A bei Klinikaufnahme. Im Verlauf fällt die Expression bis 12 Stunden nach Trauma ab und steigt im Anschluss wieder an. Die Messergebnisse zu den Zeitpunkten A, 6, 24, 48 und 72 Stunden nach Trauma sind signifikant höher als der Zwölfstundenwert ( $p < 0,05$  im Student-Newman-Keuls-Test). Die SOCS3-Expression der nativen Kontrollgruppe (Ko-) ist signifikant niedriger als die der LPS-stimulierten Kontrollgruppe ( $p = 0,002$  im Mann-Whitney-U-Test). Die Werte sind in **Tab. 22** zusammengefasst.

**Abb. 24:**



SOCS-3 mRNA in Monozyten, \*  $p < 0,05$  SNK-Test vs. 12h, #  $p = 0,016$  U-Test

Abb. 24 zeigt die SOCS3-mRNA-Expression in Monozyten polytraumatisierter Patienten ( $n=20$ ) und von Normalprobanden ( $n=5$ ) nativ (Ko-) und LPS stimuliert (LPS). Die Expression 12 Stunden nach Trauma ist gegenüber den übrigen Messzeitpunkten signifikant niedriger. Die Gruppe der nativen Normalprobanden zeigt eine signifikant niedrigere Expression als nach LPS-Stimulation.

**Tab. 22:** SOCS3-mRNA-Expression in Monozyten, Gesamtkollektiv

MW±SEM	A	6h	12h	24h	48h	72h
Patienten: n=20	6991 ± 2386 *	1875 ± 567 *	1442 ± 473	2607 ± 830 *	2221 ± 623 *	3034 ± 840 *

\*  $p < 0,05$  im SNK-Test 12h vs. A, 6h, 24-72h

#### **4.7.1.3 SOCS3-mRNA-Expression in Monozyten polytraumatisierter Patienten: Einteilung nach der Verletzungsschwere**

Die SOCS3-mRNA-Expression in Monozyten polytraumatisierter Patienten unterteilt nach der Verletzungsschwere und dem damit verbundenen NISS-Score in eine Gruppe mit weniger als 41 NISS Punkten und eine Gruppe mit 41 und mehr NISS Punkten, sowie von Normalprobanden nativ und LPS-stimuliert sind in **Abb. 25** dargestellt. In beiden Gruppen ist die initiale Expression zum Zeitpunkt A bei Klinikaufnahme gegenüber den darauffolgenden Zeitpunkten 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden erhöht. In der Gruppe der schwerer verletzten Patienten ist die SOCS3-Expression innerhalb der ersten 12 Stunden nach Trauma niedriger als in der Gruppe der leichter verletzten Patienten. Diese Unterschiede waren nicht signifikant. Die SOCS3-Expression der nativen Normalprobanden war nach LPS-Stimulation signifikant niedriger ( $p=0,016$  im Mann-Whitney-U-Test). Die Werte sind in **Tab. 23** zusammengefasst.

**Abb. 25:**

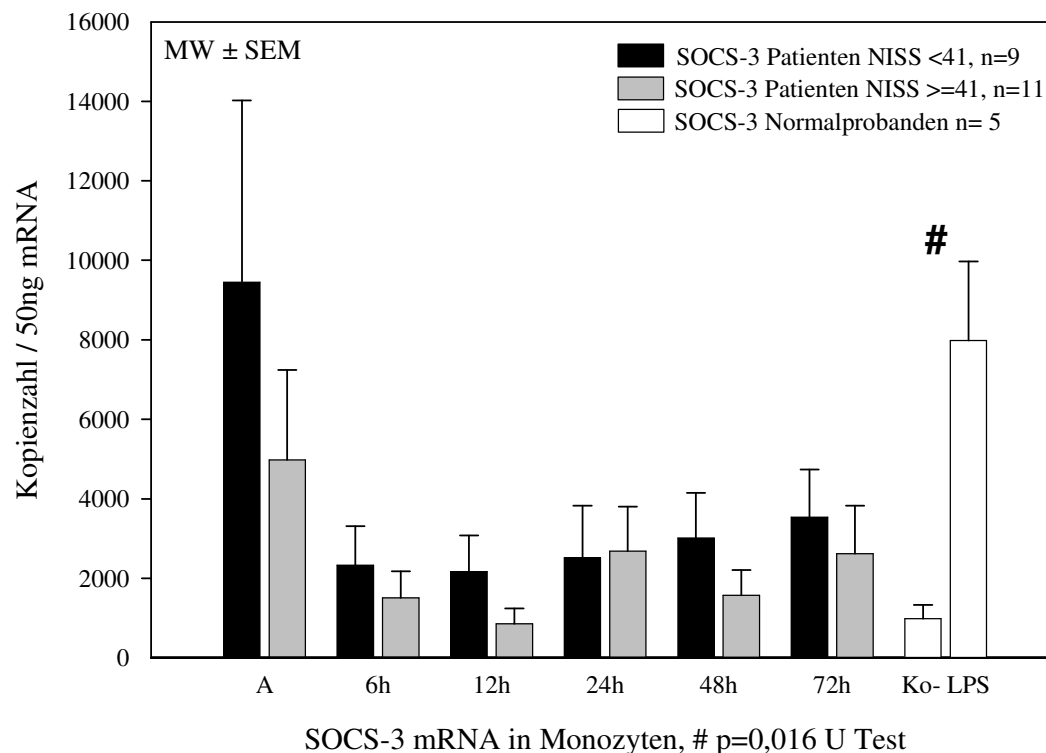


Abb. 25 zeigt die mRNA-Expression von SOCS3 in Monozyten polytraumatisierter Patienten unterteilt nach der Verletzungsschwere, sowie von Normalprobanden nativ (Ko-) und LPS-stimuliert (LPS). In beiden Gruppen ist die initiale Expression zu Zeitpunkt A bei Klinikaufnahme gegenüber den darauffolgenden Zeitpunkten 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden erhöht. In der Gruppe der schwerer verletzten Patienten ist die SOCS3-Expression innerhalb der ersten 12 Stunden nach Trauma niedriger als in der Gruppe der leichter verletzten Patienten. Die SOCS3-Expression der nativen Normalprobanden (Ko-) ist im Vergleich nach LPS-Stimulation (LPS) signifikant niedriger.

**Tab. 23:** SOCS3-mRNA-Expression in Monozyten unterteilt nach der Verletzungsschwere

MW±SEM	A	6h	12h	24h	48h	72h
NISS < 4: n=9	9451 ± 4571	2328 ± 978	2164 ± 911	2515 ± 1308	3014 ± 1137	3537 ± 1200
NISS ≥ 41:n=11	4979 ± 2258	1505 ± 674	852 ± 391	2682 ± 1122	1572 ± 632	2622 ± 1207



#### **4.7.1.4 SOCS3-mRNA-Expression in Monozyten polytraumatisierter Patienten: Einteilung nach dem Outcome**

Die Unterteilung des Patientenkollektivs nach dem klinischen Outcome 90 Tage nach Trauma in Patienten, die das Trauma überlebten und Patienten, die verstarben, ist in **Abb. 26** dargestellt. Zum initialen Zeitpunkt A bei Klinikaufnahme ist die SOCS3-mRNA-Expression der verstorbenen Patienten signifikant höher als die der überlebenden Patienten ( $p=0,042$  im Mann-Whitney-U-Test). Im übrigen Beobachtungszeitraum sind die Werte niedriger als zum initialen Zeitpunkt A, jedoch ohne deutlichen Unterschied zwischen den beiden Gruppen. 72 Stunden nach Traum ist die SOCS3-mRNA-Expression der Verstorbenen höher als die der Überlebenden. Diese Unterschiede waren nicht signifikant. Die SOCS3-Expression der nativen Normalprobanden war im Vergleich nach LPS-Stimulation signifikant niedriger ( $p=0,016$  im Mann-Whitney-U-Test). Die Werte sind in **Tab. 24** zusammengefasst.

**Abb. 26:**

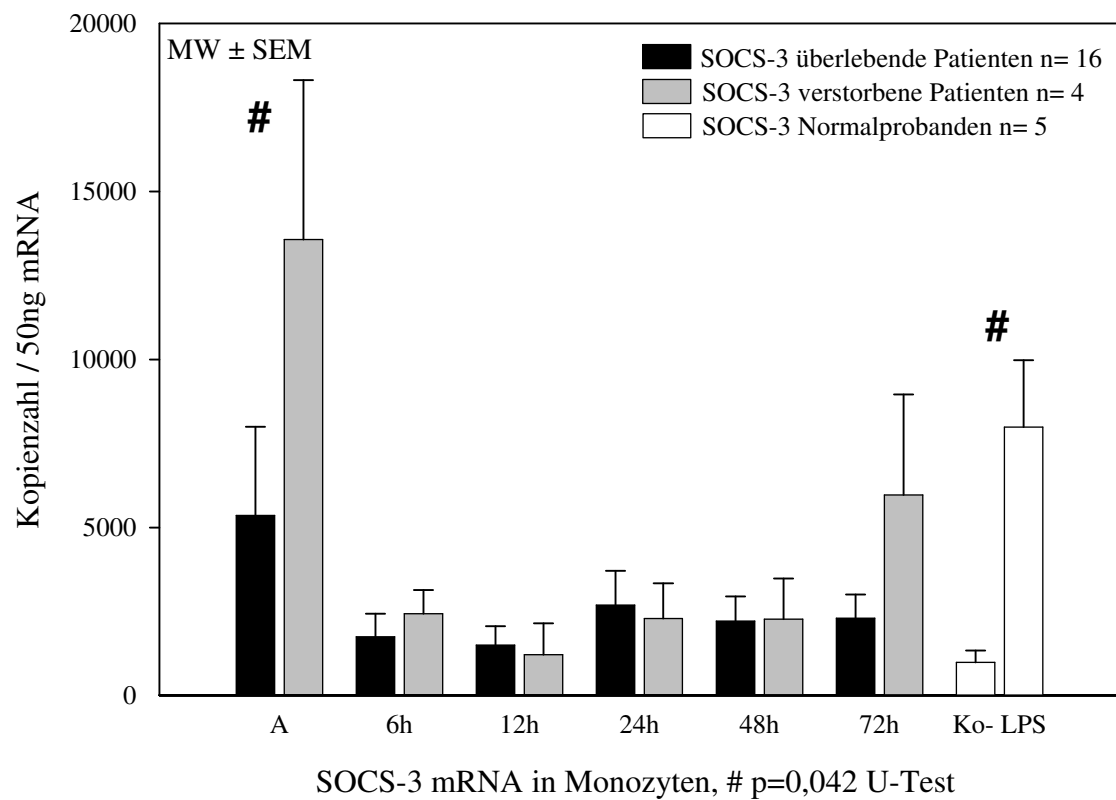


Abb. 26 zeigt die mRNA-Expression von SOCS3 in Monozyten polytraumatisierter Patienten unterteilt nach dem klinischem Outcome 90 Tage nach Trauma in Verstorbene (n=4) und Überlebende (n=16), sowie von Normalprobanden (n=5) nativ (Ko-) und LPS-stimuliert (LPS). Zum initialen Zeitpunkt A bei Klinikaufnahme ist die SOCS3-mRNA-Expression der verstorbenen Patienten signifikant höher als die der überlebenden Patienten. Im übrigen Beobachtungszeitraum sind die Werte niedriger als zum initialen Zeitpunkt A, jedoch ohne deutlichen Unterschied zwischen den beiden Gruppen. 72 Stunden nach Trauma ist die SOCS3-mRNA-Expression der Verstorbenen höher als die der Überlebenden. Die SOCS3-Expression der nativen Normalprobanden (Ko-) ist im Vergleich nach LPS-Stimulation (LPS) signifikant niedriger.

**Tab. 24:** SOCS3-mRNA-Expression in Monozyten unterteilt nach dem Outcome

MW±SEM	A	6h	12h	24h	48h	72h
überlebt: n=16	5349 ± 2644	1737 ± 691	1500 ± 557	2687 ± 1017	2208 ± 735	2300 ± 700
verstorben: n=4	13561±4747 #	2426 ± 713	1211 ± 932	2285 ± 1051	2273 ± 1211	5967 ± 2990

# p=0,042 im U-Test überlebende Patienten vs. verstorbene Patienten

## 4.7.2 SOCS3-mRNA-Expression in Granulozyten

### 4.7.2.1 SOCS3-mRNA-Expression in Granulozyten: Kontrollen

Die SOCS3-mRNA Expression in nativen Granulozyten der gesunden Probanden betrug 6660±1624 (MW±SEM) pro 50ng eingesetzte RNA. Nach artifizieller Stimulation mit LPS fiel diese auf 3510±769 (MW±SEM) ab. Diese Ergebnisse sind in den folgenden Graphen als Negativkontrolle (Ko-) und LPS dargestellt.

### 4.7.2.2 SOCS3-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten: Gesamtkollektiv

Die SOCS3-mRNA-Expression in Granulozyten ist in **Abb. 27** dargestellt. Das Expressionsmaximum liegt im initialen Wert A bei Klinikaufnahme. Im Verlauf fällt die Expression bis 24 Stunden nach Trauma ab und steigt anschließend wieder leicht an. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant. Die Werte sind in **Tab. 25** zusammengefasst.

**Abb. 27:**

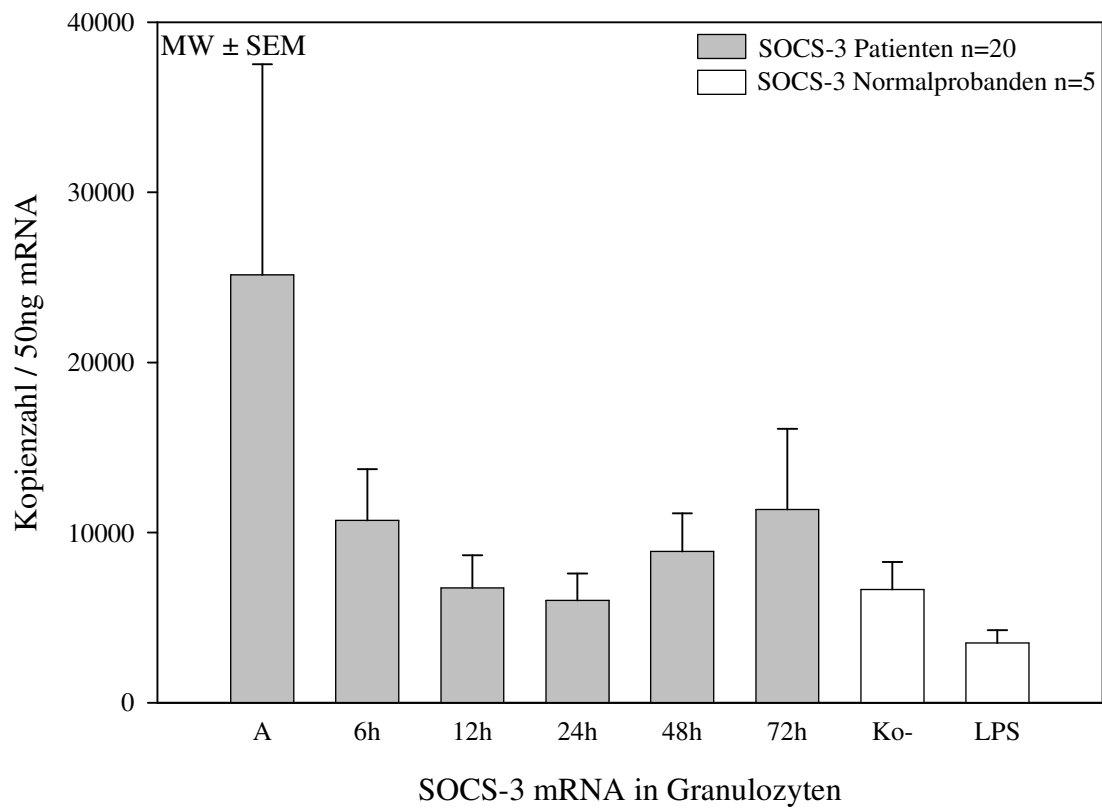


Abb. 27 zeigt die SOCS3-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten (n=20) und von Normalprobanden (n=5) nativ (Ko-) und LPS-stimuliert (LPS). Die mRNA-Expression ist zum initialen Zeitpunkt A bei Klinikaufnahme am höchsten, fällt bis 24 Stunden nach Trauma ab und steigt anschließend wieder leicht an.

**Tab. 25:** SOCS3-mRNA-Expression in Granulozyten: Gesamtkollektiv

MW±SEM	A	6h	12h	24h	48h	72h
Patienten: n=20	25161 ± 12375	10722 ± 3009	6755 ± 1911	6021 ± 1571	8886 ± 2256	11358 ± 4747

#### **4.7.2.3 SOCS3-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten: Einteilung nach der Verletzungsschwere**

Die SOCS3-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten unterteilt nach der Verletzungsschwere und dem damit verbundenen NISS-Score in eine Gruppe mit weniger als 41 NISS Punkten und eine Gruppe mit 41 und mehr NISS Punkten, sowie von Normalprobanden nativ und LPS-stimuliert sind in **Abb. 28** dargestellt. In beiden Gruppen war die initiale Expression zu Zeitpunkt A bei Klinikaufnahme gegenüber den darauffolgenden Zeitpunkten 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden erhöht und fiel bis 24 Stunden nach Trauma ab. Im Anschluss kam es zu einem leichten Expressionsanstieg. Die leichter verletzten Patienten hatten initial eine höhere SOCS3-mRNA-Expression als die schwerer Verletzten. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant. Die Werte sind in **Tab. 26** zusammengefasst.

**Abb. 28:**

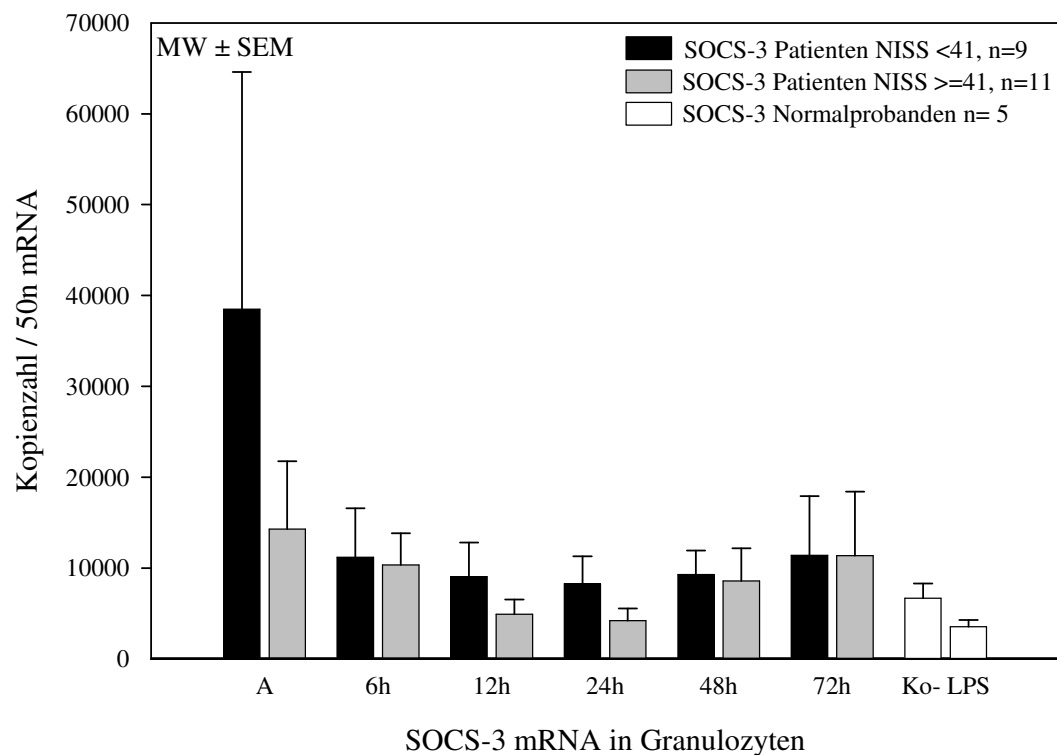


Abb. 28 zeigt die SOCS3-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten unterteilt nach der Verletzungsschwere, sowie von Normalprobanden (n=5) nativ (Ko-) und LPS-stimuliert (LPS). In beiden Gruppen ist die initiale Expression zu Zeitpunkt A bei Klinikaufnahme gegenüber den darauffolgenden Zeitpunkten 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden erhöht. In der Gruppe der leichter verletzten Patienten war die SOCS3-Expression initial höher als bei den schwerer Verletzten. Diese Unterschiede sind nicht signifikant.

**Tab. 26:** SOCS3-mRNA-Expression in Granulozyten unterteilt nach der Verletzungsschwere

MW±SEM	A	6h	12h	24h	48h	72h
NISS < 4: n=9	38478±26120	11191±5389	9034 ±3754	8250 ± 3013	9262 ± 2668	11380 ±6527
NISS ≥ 41: n=11	14265 ± 7487	10338±3498	4890±1618	4197 ±1358	8577 ± 3592	11341 ±7068

#### **4.7.2.4 SOCS3-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten: Einteilung nach dem Outcome**

Die Unterteilung des Patientenkollektivs nach dem klinischen Outcome 90 Tage nach Trauma in Patienten, die das Trauma überlebten und Patienten, die verstarben, ist in **Abb. 29** dargestellt. Zum initialen Zeitpunkt A bei Klinikaufnahme ist die SOCS3-mRNA-Expression beider Gruppen in etwa gleich groß. Im übrigen Beobachtungszeitraum sind die Werte der überlebenden Patienten deutlich niedriger als die der verstorbenen. 6 Stunden nach Trauma ist die SOCS3-Expression der verstorbenen Patienten signifikant höher als die der überlebenden ( $p=0,042$  im Mann-Whitney-U-Test). Die Werte sind in **Tab. 27** zusammengefasst.

**Abb. 29:**

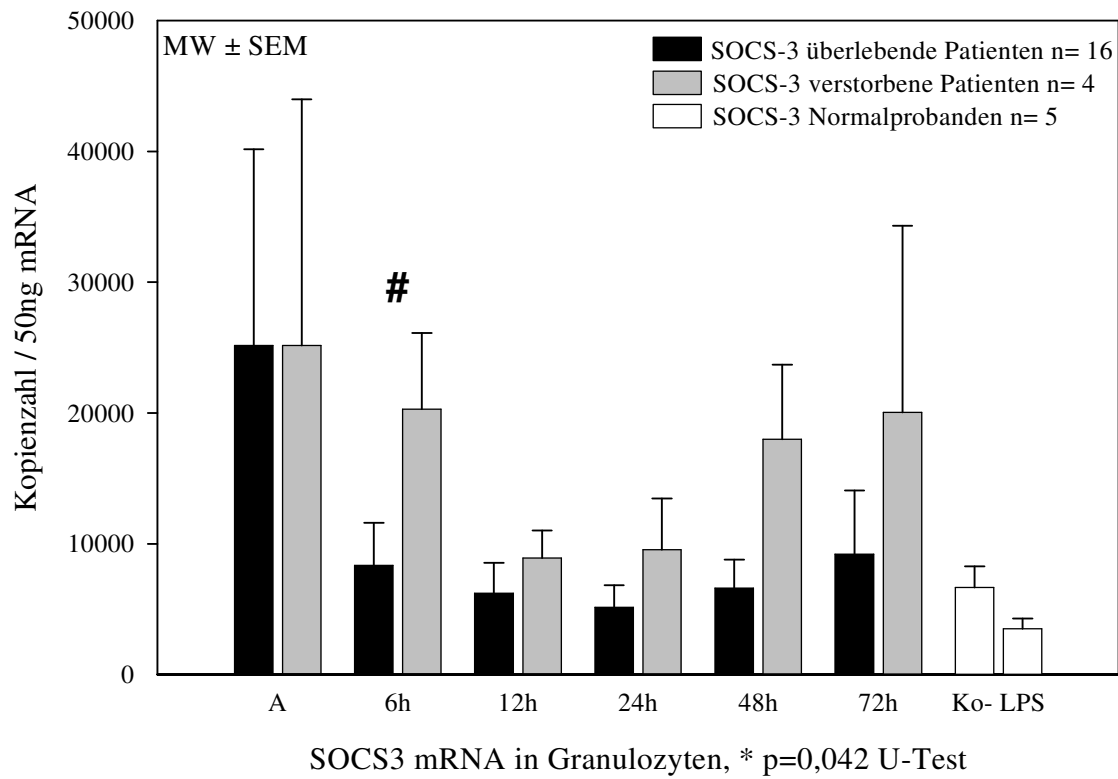


Abb. 29 zeigt die mRNA-Expression von SOCS3 in Granulozyten polytraumatisierter Patienten unterteilt nach dem klinischem Outcome 90 Tage nach Trauma in Verstorbene (n=4) und Überlebende (n=16), sowie Normalprobanden (n=5) nativ (Ko-) und LPS-stimuliert (LPS). Zum initialen Zeitpunkt A bei Klinikaufnahme ist die SOCS3-mRNA-Expression beider Gruppen in etwa gleich groß, im übrigen Beobachtungszeitraum sind die Werte der überlebenden Patienten dann deutlich niedriger als die der Verstorbenen. 6 Stunden nach Trauma ist die SOCS3-Expression der verstorbenen Patienten signifikant höher als die der überlebenden.

**Tab. 27:** SOCS3-mRNA-Expression in Granulozyten unterteilt nach dem Outcome

MW±SEM	A	6h	12h	24h	48h	72h
überlebt: n=16	25160±14993	8333 ±3276	6216 ±2337	5140 ± 1697	6614 ± 2170	9186 ± 4893
verstorben: n=4	25165±18802	20277±5828	8910 ±2108	9543 ± 3922	17973±5708	20046±14257

#

# p=0,042 im U-Test überlebende Patienten vs. verstorbene Patienten



## 5 Diskussion

Der Körper reagiert auf ein erlittenes Trauma mit einer lokalen und systemischen Entzündungsreaktion, dem *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS), welches durch Mediatoren aus dem verletzten, ischämischen Gewebe angestoßen wird. Diese posttraumatische Entzündungsreaktion besteht sowohl aus pro- als auch aus antiinflammatorischen Komponenten und kann zur Entwicklung eines Multiorganversagens (*Multiple Organ Failure*, MOF) mit Todesfolge führen (10). Die Funktionen, Wirkungsweisen und Regelmechanismen dieses posttraumatischen Entzündungsprozesses sind sehr komplex und nur teilweise geklärt (14;15). In diesem Zusammenhang wurden unlängst die *Signal Transducer And Activator of Transkription* (STAT) Proteine identifiziert. Diese Proteine fungieren als Transkriptionsfaktoren des zellulären Signallings von inflammatorischen Interleukinen und initiieren unter anderem die Expression der *Supressor Of Cytokine Signalling* (SOCS) Proteine. Diese SOCS Proteine haben eine regulierende Wirkung auf das zelluläre Signalling von inflammatorischen Zytokinen durch Hemmung der STAT-Proteine im Sinne eines negativen Feedbackloops (58;74;59;60). Für STAT3 ist auch eine autoregulatorische Wirkung über eine cAMP vermittelte STAT3-Genaktivierung durch STAT3 selbst beschrieben (134).

In dieser Arbeit wurde erstmals die mRNA-Expression der an diesem Regulationsmechanismus beteiligten Proteine im humanen Organismus in der frühen posttraumatischen Phase nach schwerem Polytrauma bestimmt. Es wurden das inflammatorische Interleukin-10, welchem eine wichtige Bedeutung bei der Entstehung der posttraumatischen Entzündungsreaktion zugeschrieben wird (50;47) und der dazugehörige Transkriptionsfaktor STAT3 untersucht (63). Außerdem wurden die Effektorproteine SOCS1 und SOCS3 gemessen (63;91;87). Die Messungen wurden auf mRNA-Ebene an aus Blut von polytraumatisierten Patienten isolierten Monozyten und Granulozyten durchgeführt. Um eine

zeitliche Dynamik in der frühen posttraumatischen Phase aufzudecken, wurde die Expression nach einem festen Schema zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen.

## **5.1 Diskussion der Methodik**

### **5.1.1 Studiendesign**

Im Studiendesign wurde eine frühe Probengewinnung nach Trauma verankert, da frühere Untersuchungen zeigten, dass bereits die initiale Phase nach Trauma einen entscheidenden Einfluss auf die Dysfunktion der humanen Zellen des unspezifischen Immunsystems hat (98;99). So konnten *Botha et al.* zeigen, dass es bei polytraumatisierten Patienten bereits innerhalb der ersten 6 Stunden nach Trauma zu einer signifikanten Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems kommt (40). Aus diesem Grund wurde die initiale Blutentnahme innerhalb von maximal 90 Minuten nach Trauma bereits nach Eintreffen im Schockraum gelegt, gefolgt von standardisierten, zeitlich eng gestaffelten seriellen Blutentnahmen 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Trauma. Aufgrund kurzer Rettungswege in der Landeshauptstadt München war ein sehr früher Zugang zu den schwerverletzten Patienten, die mit dem Rettungshubschrauber oder bodengebunden in den Schockraum der Klinik eingeliefert wurden, möglich. Die Entnahme der Blutproben erfolgte im Schockraum unmittelbar nach der Erfassung und Stabilisierung der Vitalparameter der polytraumatisierten Patienten (100;101;102). Die Blutentnahmen wurden unmittelbar im Anschluss an die diagnostisch notwendigen Blutentnahmen oder Zugänge (arterielle Blutdruckmessung, ZVK-Anlage) durchgeführt. Die weiteren seriellen Blutentnahmen erfolgten dann zu den festen Zeitpunkten auf der Intensivstation oder im Falle operativer Versorgung im Operationssaal. Bei allen Patienten war somit eine zeitlich und methodisch standardisierte Probengewinnung gewährleistet.

### 5.1.2 Patientenkollektiv

In diese Studie wurden 20 Polytrauma-Patienten mit einer Verletzungsschwere von mehr als 16 Punkten im *New Injury Severity Score*, *NISS*, eingeschlossen, die innerhalb von 90 Minuten nach Trauma den Schockraum der Klinik erreichten. Die Auswahl der Patienten erfolgte anhand der Verletzungsschwere und nicht nach spezifischen Verletzungsmustern. Durch diese Auswahl sollte die Untersuchung der Immunreaktion auf ein schweres Polytrauma sichergestellt werden, und nicht die inflammatorische Reaktion auf einzelne Verletzungen (103;104). Die Verletzungsschwere, das Alter und die Geschlechterverteilung dieses Kollektivs entsprechen dem Durchschnitt von Traumapatienten in Mitteleuropa (105). Die Dokumentation der präklinischen Daten erfolgte entsprechend den Richtlinien der *Europäischen Konsensuskonferenz zur Aufnahme von Daten polytraumatisierter Patienten* (106). Im Gegensatz zu einem hohen Anteil penetrierender Verletzungen, wie in der nordamerikanischen Literatur beschrieben, handelt es sich bei den Verletzungen in dieser Arbeit, wie auch vorwiegend im europäischen Raum, um stumpfe Verletzungen durch Hochrasanztraumen oder Stürze (4).

Neben den Untersuchungen des Gesamtkollektivs erfolgte eine Einteilung der Patienten nach der Verletzungsschwere und dem damit verbundenen *New Injury Severity Score (NISS)* nach *Osler* (96). Dieser anatomische Score baut auf dem *Injury Severity Score (ISS)* auf und repräsentiert im Gegensatz zu diesem die drei schwersten Verletzungen ohne Berücksichtigung der einzelnen verletzten Körperregionen. Die tatsächliche Verletzungsschwere wird somit besser widerspiegelt. In dieser Arbeit erfolgte die Einteilung des Kollektivs nach dem *NISS*, da er im Gegensatz zu anderen Scores eine Einteilung der inhomogenen Gruppe von Polytraumapatienten möglich macht. Es werden

keine klinischen Parameter wie Blutdruck, Herzfrequenz oder Atemfrequenz, die von bereits begonnenen Therapien beeinflusst sein könnten, mit einbezogen. Dieser Score ist seit vielen Jahren anerkannt, ermöglicht die Klassifikation der Traumaschwere und erlaubt eine Aussage über die voraussichtliche Morbidität und Mortalität (107). Aus retrospektiven Untersuchungen ist bekannt, dass bei hoher Verletzungsschwere nach einem Polytrauma die Inzidenz für die Entwicklung eines posttraumatischen *Systemic Inflammatory Responses Syndrome, SIRS* bei 80% und für die Entwicklung eines posttraumatischen Multiorganversagens (*Multiple Organ Dysfunction Syndrome, MODS*) bei 85% liegt (108). Zur Unterteilung des Patientenkollektivs wurde ein NISS von 41 Punkten gewählt, da dieser Wert den Median repräsentiert.

### **5.1.3 Positivkontrolle**

In der Literatur wird die Stimulation mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) als starker inflammatorischer Stimulus auf Monozyten beschrieben, welcher eine Aktivierung der am JAK/STAT- Regulationsmechanismus beteiligten Mediatoren wie STAT3 und infolge eine Expressionssteigerung von SOCS1, SOCS3 und IL-10 bewirkt (135;136;137;138). Aus diesem Grund sollte überprüft werden, ob mit dieser Methode eine Expressionsänderung der oben genannten Mediatoren durch LPS nachzuweisen ist und ob sich diese mit der in der Literatur beschriebenen Induktion deckt. Somit könnten LPS-stimulierte Zellen als eine mögliche Positivkontrolle identifiziert werden.

Die Ergebnisse nach LPS-Stimulation zeigten ein uneinheitliches Bild mit einer Steigerung der Expression von IL-10 und SOCS1 und einem Rückgang von SOCS3. Die vorbeschriebene Induktion von SOCS3 konnte in den Messungen folglich nicht bestätigt werden. Ursachen hierfür könnten mögliche regulatorische Prozesse sein, die in unserem Versuchsaufbau zum Tragen kommen. Um der Diskrepanz genauer nachzugehen, wären weitere Untersuchungen auf Protein- und Zytokinebene nötig. Durch die mRNA-Daten scheint eine Etablierung von

LPS-stimulierten Monozyten als Positivkontrolle des JAK/STAT-Regulationsmechanismus auf mRNA-Ebene fraglich.

In Granulozyten konnten Malcolm et al. zeigen, dass es nach LPS-Stimulation nicht zur Aktivierung des JAK/STAT Systems kommt (139). Die Ergebnisse dieser Studie zeigten jedoch einen Rückgang der Expression von STAT3, SOCS1 und SOCS3 sowie einen Anstieg von IL-10 nach LPS-Stimulation von Granulozyten. Unklar ist jedoch, über welchen Mechanismus diese Expressionsänderung getriggert ist. Um dies zu verfolgen, sind weitere Untersuchungen, insbesondere auf Proteinebene, nötig.

#### **5.1.4 Zellisolation**

Um eine hohe Reinheit der isolierten Monozyten und Granulozyten zu erreichen, wurde die positive immunomagnetische Separationstechnik (MACS) verwendet (109). Andere Autoren verwendeten zu diesem Zweck die Dichtegradient-Zentrifugation (110;111). Für diese Technik wurde aber eine sehr viel größere Aktivierung von Immunzellen im Vergleich zu der MACS-Technik beschrieben (112). Eine weitere Alternative wäre die negative immunomagnetische Separationstechnik gewesen. Der Vorteil dieser Technik ist eine hoch selektive Separation der Zellen verbunden mit einer geringen Zellaktivierung (113). Die Ausbeute ist aber erheblich geringer als die der verwendeten MACS-Technik. Somit wären pro Messzeitpunkt erheblich höhere Blutvolumina nötig, welche aber von Trauma-Patienten schwer kompensiert werden können, da der Blutverlust einer der klinisch determinierenden Faktoren ist. Aus diesem Grund verwendeten wir die positive immunomagnetische Separations-Technik, welche mit einem Maximum von 30ml Vollblut pro Probenentnahme durchführbar ist. Die Reinheit der von uns durchgeführten Zellisolation wurde in Studien der Arbeitsgruppe mittels Durchflusszytometrie kontrolliert und lag bei 95% (141) und  $87 \pm 3\%$  für Monozyten und bei  $92 \pm 4\%$  für Granulozyten (142).

Die Methodik zur nukleären Proteinextraktion (mRNA und cDNA-Gewinnung) wurde schon mehrmals in der Literatur beschrieben (114;103;115) und ist gut erprobt.

Die Messungen mittels quantitativer RT-PCR wurden mit dem *Light Cycler* der Firma Roche durchgeführt, es handelt sich um eine vielfach angewandte und gut validierte Methode (116).

## **5.2 Monozyten**

Monozyten sind Zellen des angeborenen Immunsystems und entscheidend an der Entstehung der posttraumatischen Entzündungsreaktion beteiligt. In der lokalen Traumaantwort werden sie zum größten Teil aus Blutmonozyten rekrutiert und wandern infolge chemotaktischer Signale in das verletzte Gewebe, um dort am Wundheilungsmechanismus durch Debridement und Sekretion biologischer Substanzen teilzuhaben (6;28). *Müller Kobold et al* zeigten eine vermehrte Aktivierung der Blutmonozyten in Sepsispatienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe, wobei eine vergleichsweise verminderte Aktivierung mit einer schlechten Prognose korrelierte (29). Neben den in dieser Arbeit untersuchten Blutmonozyten spielen ortständige Monozyten ebenfalls eine wichtige Rolle in der posttraumatischen Entzündungsreaktion. Ortständige Monozyten des retikuloendothelialen Systems, die hauptsächlich in Leber und Milz lokalisiert sind, phagozytieren pathogene Bestandteile aus dem Blut. Es kommt zu einer Aktivierung des Komplementsystems und damit zu einer vermehrten Freisetzung von Entzündungsmediatoren mit Verstärkung der inflammatorischen Reaktion (117;118;119). Eine Probengewinnung dieser ortständigen Monozyten ist bei Traumapatienten jedoch nicht durchführbar, weshalb sich unsere Untersuchungen auf die Blutmonozyten konzentrierten.

### **5.3 Granulozyten**

Neutrophile Granulozyten bilden mit 50-60% den größten Anteil aller im Blut zirkulierender Leukozyten und spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der posttraumatischen Entzündungsreaktion. Sie sind die erste immunologische Abwehr gegen Mikroorganismen und migrieren zur Wundheilung und zur Abwehr von Mikroorganismen in das verletzte Gewebe. Neben dem lokalen Nutzen der aktivierten Granulozyten führt eine systemische Aktivierung zur Migration in Organe, die nicht primär durch das Trauma verletzt wurden. In diesen Organen sind sie der Auslöser für sekundäre Organ- und Gewebsschäden, die zur Entwicklung eines MOF führen können (25;26;27;120). Stimulierte Granulozyten sind in der Lage, inflammatorische Mediatoren zu synthetisieren (111). Bei einer Dysfunktion kommt es zur unregelmäßigen Expression von inflammatorischen Mediatoren (121;122). Aufgrund dieser wichtigen Rolle in der posttraumatischen Entzündungsreaktion untersuchten wir Granulozyten aus Blutproben polytraumatisierter Patienten.

### **5.4 Interleukin-10**

Das antiinflammatorische Zytokin Interleukin-10 (IL-10) hat eine hemmende Wirkung auf die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (43). Bisherige Studien weisen auf eine wichtige Rolle von IL-10 auch bei der Regulation des posttraumatischen Entzündungsprozesses hin (123). So wird die posttraumatische Steigerung der IL-10 Produktion als protektiver Effekt bei der Kontrolle der entstehenden Entzündungsreaktion angesehen (124), da IL-10 die Induktion inflammatorischer Zytokine hemmt (125). Eine Neutralisation von IL-10 durch Antikörper zeigte im Tierversuchmodell eine höhere Letalität (126). Es konnte ein Anstieg der IL-10 Serumkonzentration im humanen Organismus nach Polytrauma (47;43;50) und eine Korrelation mit der Verletzungsschwere gezeigt werden (52). Andere Studien gehen jedoch davon aus, dass die Wirkung von hohen IL-10-Spiegeln nach Trauma durch

vermittelte Immunsuppression schädlich ist (50). In dieser Arbeit wurden im Gegensatz zur bisherigen Literatur die Messungen von IL-10 auf mRNA-Ebene an Monozyten und Granulozyten aus Vollblut polytraumatisierter Patienten durchgeführt. Eine basale IL-10-mRNA-Expression konnte sowohl in Monozyten als auch in Granulozyten von gesunden Probanden der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Eine artifizielle Stimulation mit LPS ergab in Monozyten einen Anstieg der IL-10-mRNA-Expression wie auch in der Literatur auf Proteinebene beschrieben (138). In Granulozyten war diese nach Stimulation reduziert. Diese diskrepanten Ergebnisse geben Hinweise auf eine unterschiedliche Reaktion der beiden Zellreihen auf die LPS-Stimulation, womöglich wirken verschiedene regulatorische Mechanismen. Der in der Literatur beschriebene IL-10-Anstieg nach Trauma und LPS-Stimulation (47;50;138) spiegelt sich demnach auf mRNA-Ebene nur in Monozyten wieder.



### **5.4.1 Interleukin-10-mRNA-Expression in Monozyten polytraumatisierter Patienten**

Diese Arbeit zeigt in Monozyten polytraumatisierter Patienten einen signifikanten Anstieg der IL-10-mRNA-Expression im Vergleich zum initialen Wert bei Klinikaufnahme, mit einem Maximum bereits 6 Stunden nach dem Unfallgeschehen. Zudem sind die Ergebnisse gegenüber der gesunden Kontrollgruppe erhöht. Diese Erhöhung ist 12 Stunden nach Trauma signifikant. Das Ergebnis bestätigt die in Studien beschriebene erhöhte IL-10-Serum-Konzentration nach Trauma (52;47) auf mRNA-Ebene in Monozyten und zeigt eine Induktion des IL-10-Genes in Monozyten bereits innerhalb der ersten 6 Stunden nach Trauma mit anschließendem Expressionsrückgang. Dieser Expressionsrückgang könnte auf regulatorische Mechanismen zurückzuführen sein. Eine Aufteilung des Patientenkollektivs nach der Verletzungsschwere ergibt eine höhere IL-10-Expression bei den leichter verletzten Patienten mit einem NISS von weniger als 41 Punkten zu allen Messzeitpunkten. 12 und 48 Stunden nach Trauma ist die IL-10-Expression signifikant gegenüber den schwerer verletzten Patienten erhöht. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den in Studien beschriebenen höheren IL-10-Serum-Konzentrationen bei schwerer verletzten Patienten (52). Diese Unterschiede können durch das unterschiedliche Probenmaterial erklärt werden. Bei *Neidhard et al* wurde die IL-10-Serum-Konzentration, welche die Gesamtheit des Proteins ohne Berücksichtigung der sezernierenden Zelle widerspiegelt, gemessen. In dieser Studie wurde die mRNA-Expression aus Monozyten, ohne Berücksichtigung der späteren Translation und Sekretion untersucht. Der geringere Anstieg der IL-10-Expression bei schwerer verletzten Patienten könnte Hinweise auf einen größeren Einfluss regulierender Mechanismen geben. Es wäre denkbar, dass das größere Verletzungsausmaß einen stärkeren Stimulus auf

regulatorische Mechanismen der zellulären Signalübertragung setzt, der unter anderem zur verminderten Expression von IL-10-mRNA in Monozyten führt.

Die Bedeutung von IL-10 in der posttraumatischen Inflammation und Sepsis ist bisher kontrovers beschrieben. Einigen Studien gehen davon aus, dass die Wirkung von hohen IL-10 Spiegeln nach Trauma durch vermittelte Immunsuppression schädlich ist (50). Andere Studien sehen jedoch einen Vorteil von hohen IL-10-Spiegeln durch ein Eingrenzen der Inflammatorischen Antwort und somit einer Balancierung von pro- und antiinflammatorischen Mediatoren, um Repartitionsmechanismen und Heilungsmechanismen zu optimieren (140). In dieser Studie könnte die höhere mRNA-Expression des antiinflammatorischen IL-10 bei leichter Verletzten den zwischenzeitlich erfolgreichen Versuch der Balancierung zwischen pro- und antiinflammatorischen Mediatoren im Vergleich zu den schwerer Verletzten widerspiegeln. Somit wäre das Konzept der Dämpfung der proinflammatorischen Antwort durch IL-10 unterstützt.

Eine Unterteilung des Patientenkollektivs nach dem klinischen Outcome 90 Tage nach Trauma in Verstorbene und Überlebende, zeigte die Tendenz einer höheren IL-10-Expression der verstorbenen Patienten mit Ausnahme des Zwölfstundenwertes zu allen Abnahmezeitpunkten. Dieses Ergebnis deckt sich mit der in der Literatur beschriebenen höheren IL-10-Serumkonzentration von verstorbenen Patienten (52), und unterstützt wiederum die Ansicht einer schädlichen IL-10 Überexpression (50).

## **5.4.2 Interleukin-10-mRNA-Expression in Granulozyten**

### **polytraumatisierter Patienten**

Die Ergebnisse der IL-10-mRNA-Expression in Granulozyten zeigten eine signifikante Expressionssteigerung gegenüber dem initialen Wert bei Krankenhausaufnahme. Diese Ergebnisse decken sich mit der in der Literatur beschriebenen IL-10 Serumkonzentrations-

Steigerung nach Trauma (52;47). Eine Unterteilung des Patientenkollektivs nach der anatomischen Verletzungsschwere und dem damit verbundenen *NISS*-Score ergibt eine signifikant höhere IL-10-Expression der leichter verletzten Patienten bereits unmittelbar bei Klinikaufnahme, sowie 24, 48 und 72 Stunden nach Trauma. In beiden Gruppen steigt die Expression, wie im Gesamtkollektiv, signifikant gegenüber dem initialen Wert an.

In Bezug auf die kontrovers beschriebene Wirkung von IL-10 (siehe 5.4.1) sind diese Ergebnisse in einer Linie mit der Ansicht eines erfolgreichen Balancing der pro- und antiinflammatorischen Antwort durch IL-10 zu sehen. Dieses Ergebnis und dessen Einordnung decken sich mit dem der monozytären Messungen (siehe 5.4.1).

Eine Unterteilung des Patientenkollektivs nach dem klinischen Follow up 90 Tage nach Trauma in Verstorbene und Überlebende zeigt in beiden Gruppen, wie auch im Gesamtkollektiv, eine erhöhte Expression zu allen Abnahmezeitpunkten gegenüber dem initialen Wert. Eindeutige Unterschiede zwischen den beiden Gruppen sind nicht zu erkennen. Die IL-10 mRNA Expression scheint keinen messbaren Einfluss auf das Überleben zu haben.

## **5.5 STAT3**

STAT3 ist ein Transkriptionsfaktor des zellulären Signallings von inflammatorischen Zytokinen. Diesem Protein wird ein wichtiger Einfluss bei der Regulation von Entzündungsprozessen zugeschrieben, da es sowohl von pro- als auch von antiinflammatorischen Zytokinen, wie Interleukin-10, aktiviert wird (73;71;127;56). Eine Regulation dieses Transkriptionsfaktors wird als wichtiger Schritt bei der Überwindung von systemischen Entzündungen angesehen (128). Im humanen Mechanismus wurde eine Aktivierung von STAT3 unlängst bei entzündlichen Erkrankungen wie Morbus Crohn und rheumatoider Arthritis beschrieben (73;72). Auf Transkriptionsebene ist eine

autoregulatorische Wirkung durch Aktivierung des eigenen Gens durch STAT3 beschrieben (134).

### **5.5.1 STAT3-mRNA-Expression in Monozyten polytraumatisierter Patienten**

Die STAT3-mRNA-Expression in Monozyten steigt bis 6 Stunden nach Trauma an und fällt im Anschluss wieder ab. Statistisch signifikante Unterschiede konnten nicht gezeigt werden. Die in der Literatur beschriebene Aktivierung von STAT3 durch entzündliche Erkrankungen (69;72;73;68) und durch die inflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-10 (63) sowie deren Autoinduktion (134) wird in dieser Arbeit auf mRNA-Ebene in Monozyten nur tendentiell wiedergespiegelt. Eine Unterteilung des Patientenkollektivs nach der Verletzungsschwere und dem damit verbundenen NISS-Score zeigt die Tendenz einer höheren STAT3-Expression bei den leichter verletzten Patienten. Dies könnte Ausdruck einer erfolgreicherer Regulation im Bezug auf die Balancierung von pro- und antiinflammatorischen Mediatoren, wie bereits zuvor diskutiert (siehe 5.4.1) auch bei der STAT3-Expression sein. Im Bezug auf diese Balancierung kann man auch das Ergebnis der Unterteilung des Patientenkollektivs nach dem klinischen Follow up 90 Tage nach Trauma in Überlebende und Verstorbene sehen. Bei den später Versterbenden zeigt sich in den ersten 6 Stunden nach Trauma die Tendenz einer höheren STAT3-Expression welche im weiteren Verlauf jedoch niedriger als bei den Überlebenden ist. Es scheint zwischen 6 und 12 Stunden nach Trauma eine Regulation der STAT3-Expression stattzufinden, welche das spätere Outcome ungünstig beeinflusst. Diese Untersuchungen auf mRNA-Ebene können jedoch nur einen Hinweis auf mögliche Einflüsse geben, da keine Aussagen über eine spätere Translation und Wirkung gemacht werden können. Es sind weitere Untersuchungen auf Proteinebene nötig um diese Ergebnisse zu festigen.

### **5.5.2 STAT3-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten**

Diese Studie zeigt erstmalig eine signifikante Induktion von STAT3-mRNA in humanen Granulozyten nach Polytrauma. Der frühe Anstieg, bereits innerhalb der ersten 6 Stunden nach Trauma, passt zur unlängst beschriebenen frühen Erhöhung der IL-6 Serumkonzentrationen bei Polytraumapatienten (35), da eine Aktivierung von STAT3 durch IL-6 bereits nachgewiesen werden konnte (129;130). Somit kann der in dieser Arbeit gezeigte frühe STAT3-mRNA Anstieg analog zum IL-6-Signalling über den JAK/STAT-Signaltransduktionsweg gesehen werden und könnte über die unlängst beschriebenen autoregulatorischen Prozesse stattfinden (134).

Im Anschluss an das Expressionsmaximum 6 Stunden nach Trauma kommt es zu einem signifikanten Abfall der mRNA-Expression. Grund für diesen Rückgang kann die Wirkung von regulatorischen Mechanismen, wie zum Beispiel die von SOCS-Proteinen sein. Durch die SOCS vermittelte Hemmung der STAT3-Proteine könnte auch die STAT3-mRNA-Expression zurückgehen. Eine Unterteilung des Patientenkollektivs anhand der Verletzungsschwere in eine Gruppe mit 41 *NISS*-Punkten oder mehr und eine Gruppe mit weniger als 41 Punkten ergibt in beiden Gruppen ein Expressionsmaximum 6 Stunden nach Trauma. Die Gruppe der leichter Verletzten zeigte zu allen Abnahmezeitpunkten eine höhere STAT3-mRNA-Expression. Eine mögliche Ursache hierfür könnte auch eine geringere Regulation bei leichter Verletzten und somit ein geringerer Rückgang der STAT3-Expression sein. Die Unterteilung nach dem klinischen Follow up 90 Tage nach Trauma in Überlebende und Verstorbene zeigt initial bei Klinikaufnahme eine niedrigere Expression der Verstorbenen. Ab der Sechsstundenmessung ist die STAT3-mRNA-Expression jedoch gegenüber den Überlebenden erhöht. Der Unterschied beider Gruppen könnte ebenso auf eine unterschiedlich starke Regulation der STAT3-Induktion hindeuten, welche das Outcome

beeinflusst. Diese Ergebnisse sind analog zu den Ergebnissen der Messungen in Monozyten. Um eine Einordnung dieser Hinweise durchführen zu können sind weitere Untersuchungen auf Proteinebene nötig.

## **5.6 SOCS1**

Die inflammatorischen Interleukine IL-6 und IL-10 bewirken eine Induktion des Effektorproteins SOCS1 (58), welches wiederum das Signalling dieser Interleukine durch Hemmung des JAK/STAT Signaltransduktionsweges im Sinne eines negativen Feedbackloops hemmt (87;131). Durch diese Funktion könnte das SOCS1-Protein einen wichtigen Einfluss auf die Regulation von Entzündungsprozessen haben.

### **5.6.1 SOCS1-mRNA-Expression in Monozyten polytraumatisierter Patienten**

Im Gesamtkollektiv sinkt die SOCS1-mRNA-Expression innerhalb des Beobachtungszeitraumes tendenziell leicht ab. In dieser Zellreihe ist jedoch keine eindeutige Dynamik der mRNA-Expression zu erkennen. SOCS1 ist ein wichtiger Regulator des Signallings von Inflammatorische Zytokinen wie IL-6 als auch IL-10 über den JAK/STAT Signaltransduktionsweg (22;85;86;87). Folglich wäre ein Expressionsanstieg von SOCS1 im Einklang mit dem beschriebenen IL-6 und IL-10 anstieg sowie der STAT3 Aktivierung nach Trauma zu erwartet (32,50,63). Die Daten dieser Studie können dies in Monozyten jedoch nicht bestätigen. Ein Grund hierfür könnte die Diskrepanz von gemessener mRNA und spätern Proteinen und dessen Aktivität sein. Jedoch zeigt sich bei der Aufteilung des Patientenkollektivs nach dem Outcome 90 Tage nach Trauma in Überlebende und Verstorbene ein signifikanter Expressionsabfall der SOCS1-mRNA-Expression in der Gruppe der Verstorbenen. 48 Stunden nach Trauma kommt es in dieser Gruppe zu einem erneuten Anstieg der Expression, die zu diesem Zeitpunkt signifikant gegenüber den Überlebenden

erhöht ist. Dieses Ergebnis deutet auf eine Dysregulation des JAK/STAT-Signaltransduktionswegs mit einer überschießenden SOCS1 mRNA-Expression und ungünstigem späteren Verlauf hin.

Unterteilt man das Kollektiv nach der Verletzungsschwere und dem damit verbundenen NISS, zeigt sich in der Gruppe der leichter Verletzten eine tendenziell höhere SOCS1-mRNA-Expression, die sich während des Beobachtungszeitraumes an die der schwerer Verletzten annähert. Diese Ergebnisse geben Hinweis auf eine Regulation der Inflammation über die hemmende Wirkung von SOCS1 bei leichter Verletzten Patienten und steht somit im Einklang mit der beschriebenen Regulation des IL-6 und IL-10 Signallings durch SOCS1 (85,86,87). Die beschriebene Dysregulation der Immunantwort nach Trauma (10) könnte sich in der niedrigeren SOCS1 Expression schwerer Verletzter Patienten widerspiegeln. Ein Grund für die nicht signifikanten Unterschiede der beiden Gruppen könnte in der Einteilung liegen, da es keine Empfehlungen bezüglich der Einteilung innerhalb des NISS-Scores gibt entschieden wir und letztendlich für den Median als Grenze.

### **5.6.2 SOCS1-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten**

Die SOCS1-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten war bereits zum initialen Zeitpunkt 90 Minuten nach Trauma signifikant niedriger als die der gesunden Kontrollgruppe. Im weiteren Verlauf fiel die mRNA-Expression gegenüber dem initialen Wert weiter signifikant ab. Aufgrund des beschriebenen Anstiegs von IL-6 und IL-10 nach Trauma und der damit verbundenen Autoregulation des zellulären Signalling über SOCS1 (22;46;124) wäre ein Anstieg der SOCS1 Expression zu erwarten gewesen. Interessanterweise zeigen die Ergebnisse dieser Studie in Granulozyten jedoch einen Rückgang der Expression. Dies könnte man als eine verminderte Hemmung des Cytokinsignallings durch eine verminderte SOCS1

mRNA-Expressionssteigerung deuten. Kritisch muß jedoch die Diskrepanz zwischen der mRNA-Expression und der Protein Expression betrachtet werden. Erwartete Änderungen in der Protein Aktivität müssen sich nicht einfach in der mRNA Expression widerspiegeln.

Eine Unterteilung des Patientenkollektivs anhand der Verletzungsschwere und dem damit verbundenen *NISS*, sowie nach dem klinischen Outcome 90 Tage nach Trauma in Überlebende und Verstorbene, bestätigt die Ergebnisse des Gesamtkollektivs, zeigt aber keinen eindeutigen Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Da es keine Empfehlungen über die Grenzziehung zweier Gruppen bezüglich der Verletzungsschwere und dem NIS-Score gibt, wurde in dieser Studie hierfür der Median gewählt. Dies kann die fehlenden Unterschiede bei der Unterteilung nach der Verletzungsschwere erklären.

## **5.7 SOCS3**

Wie SOCS1 ist auch SOCS3 ein Effektorprotein inflammatorischer Interleukine, das unter anderem auch von IL-6 und IL-10 induziert wird (132;131;133). Es hat die Funktion eines negativen Regulators des zellulären JAK/STAT-Signaltransduktionsweges im Sinne eines negativen Feedbackloops.

### **5.7.1 SOCS3-mRNA-Expression in Monozyten polytraumatisierter Patienten**

Diese Studie zeigt eine Induktion der SOCS3-mRNA bereits innerhalb der ersten 90 Minuten nach Trauma, die im Verlauf der ersten 12 Stunden abfällt. Dieses Ergebnis steht somit im Einklang mit der bereits beschriebenen Induktion von SOCS3 durch IL-6 und IL-10 (84,91). Eine Erklärung für den Rückgang im Verlauf kann in der beschriebenen autoregulatorischen Wirkung von SOCS3 liegen. So hemmt SOCS3 den eigenen Transkriptionsfaktor STAT3 (88) und damit auch die eigene mRNA-Expression. Eine Unterteilung des Patientenkollektivs nach



der Verletzungsschwere und dem damit verbundenen *NISS* ergibt keinen eindeutigen Hinweis auf einen Unterschied der beiden Gruppen, zeigt jedoch die Tendenz einer höheren Expression der leichter Verletzten. Dies könnte Ausdruck einer stattfindenden Autoregulation des Zytokinsignallings über den beschriebenen JAK-STAT-Signaltransduktionsweg sein (88). Die fehlende Signifikanz lässt sich womöglich mit der Gruppeneinteilung anhand des Medians, erklären welche womöglich keine adäquate Grenze widerspiegelt.

Die Unterteilung des Patientenkollektivs nach dem klinischen Outcome gibt Hinweise auf die entscheidende Bedeutung dieses regulatorischen Proteins. Patienten, die in der posttraumatischen Phase versterben, exprimieren nach einem Trauma signifikant stärker SOCS3-mRNA als Patienten, die überleben. SOCS3 ist in der Lage, das zelluläre Signalling zu hemmen, indem es die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 hemmt (88). Die größere mRNA-Expression von SOCS3 bei verstorbenen Patienten könnte eine überschießende Regulation des JAK/STAT Signaltransduktionsweges durch das SOCS3 Protein bewirken, was eine mögliche zelluläre Ursache für das spätere Versterben sein könnte. Kritisch muß jedoch auch hier die Diskrepanz zwischen der mRNA-Expression und der Protein-Expression betrachtet werden. Erwartete Änderungen in der Protein Aktivität müssen sich nicht einfach in der mRNA-Expression widerspiegeln.

### **5.7.2 SOCS3-mRNA-Expression in Granulozyten polytraumatisierter Patienten**

In humanen Granulozyten kommt es tendenziell zu einer Induktion von SOCS3 bereits 90 Minuten nach Trauma. Dieses Ergebnis steht somit im Einklang mit der bereits beschriebenen Induktion von SOCS3 durch IL-6 und IL-10 (84,91). Im weiteren Verlauf fällt die SOCS3-mRNA-Expression nach Polytrauma gegenüber dem Ausgangswert ab. Eine Ursache dieser Expressionsveränderung kann die beschriebene autoregulatorische Wirkung von SOCS3

durch Hemmung des eigenen Transkriptionsfaktors STAT3 sein (88). Eine Aufteilung des Patientenkollektivs nach der Verletzungsschwere ergibt keine signifikanten Unterschiede der Gruppen. Die Unterteilung nach dem späteren Outcome in Überlebende und Verstorbene zeigt initial keinen Expressionsunterschied 6 Stunden nach Trauma exprimieren die Verstorbenen signifikant mehr SOCS3-mRNA als die Überlebenden. Grund hierfür könnte ein Versagen der Autoregulation von SOCS3 sein, welches als Folge einer Dysregulation des posttraumatischen Entzündungsprozesses zu sehen ist und im Verlauf zum Versterben der Patienten führen könnte, wie von Hietbrink et al. beschrieben (6).

## 5.8 Limitationen

Limitationen dieser Arbeit ergeben sich aufgrund des vulnerablen Patientengutes von polytraumatisierten Patienten, die sich nach dem erlittenen Trauma häufig in einem hämodynamisch instabilen Zustand befinden. Dieser limitiert die Menge und Art der für Studienzwecke zu gewinnender Proben. Um immunaktive Zellen zu erhalten, entschieden wir uns folglich für die Isolierung von Monozyten und Granulozyten aus Vollblut, da eine Gewinnung der Zellen durch etwa Organpunktionen bei dieser Patientengruppe nicht zu vertreten ist. Eine mögliche immunologische Aktivierung der Zellen durch die Methode der Zellisolation mittels des positiven MACS Systems musste aufgrund der begrenzten Probenmenge hingenommen werden.

Nach Trauma kommt es zu einer kontinuierlichen Immunmodulation bereits in den ersten Stunden nach Trauma. Eine serielle Untersuchung wie in dieser Studie durchgeführt, mit festen Messzeitpunkten durch Probengewinnung initial sowie 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Trauma, kann diese Dynamik nur begrenzt abbilden. Sie ist jedoch aufgrund der zeitaufwändigen Probenverarbeitung und des begrenzten Probenmaterials unumgänglich.

In dieser Studie wurden Messungen auf mRNA Ebene durchgeführt. Es können jedoch keine Aussagen über eine spätere Translation und somit Wirkung auf Protein-Ebene getroffen werden. Um eine mögliche klinische Relevanz zu zeigen, sind fortführende Untersuchungen auf Proteinebene nötig.

Bei den Untersuchungen der Kontrollen konnte keine verlässliche Positivkontrollgruppe generiert werden, was die Aussagekraft auf die Patientenergebnisse schmälert.

Die Messungen von Interleukin-6 funktionierten mit den verwendeten Primern nicht. Die Ursachen hierfür wurden nicht eruiert. Die Messungen dieses proinflammatorischen Interleukins wären für die weitere Einordnung der Ergebnisse interessant gewesen.

Um eine Verunreinigung der Proben durch DNA möglichst gering zu halten, erfolgte die Behandlung der Proben mit DNase vor dem Umschreiben der RNA in cDNA mittels Reverse-Transkriptase. Eine Überprüfung auf eine Rest-DNA-Kontamination mittels RT-PCR ohne vorherige Reverse-Transkriptase-Behandlung wurde nicht durchgeführt.

## 5.9 Schlussfolgerung

Aus den Daten der vorliegenden Arbeit lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

In gesunden Normalprobanden lässt sich die basale mRNA-Expression von IL-10, STAT3, SOCS1 und SOCS3 detektieren. Die IL-6-mRNA-Expression ließ sich mit der in dieser Arbeit angewendeten Methode nicht analysieren.

Die Stimulation mit LPS zeigt in Monozyten eine signifikante Induktion der mRNA-Synthese von SOCS1 und SOCS3, sowie eine deutliche Induktion von IL-10-mRNA. Die STAT3-mRNA-Expression ist nach LPS-Stimulation in beiden Zellreihen, die IL-10, SOCS1 und SOCS3-Expression in Granulozyten erniedrigt.

In Monozyten und Granulozyten polytraumatisierter Patienten steigt in der frühen posttraumatischen Phase die IL-10-mRNA-Expression signifikant gegenüber dem initialen Wert bei Klinikaufnahme an. Ebenso kommt es sechs Stunden nach Trauma zu einem signifikanten Anstieg der STAT3-mRNA-Expression in Granulozyten. Die SOCS1-mRNA-Expression in Granulozyten fällt gegenüber dem initialen Wert bei Klinikaufnahme und im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant ab. Die SOCS3-Expression fällt bis zwölf Stunden nach Trauma in Monozyten signifikant und in Granulozyten deutlich ab. Die monozytäre mRNA-Expression von STAT3 und SOCS1 zeigt innerhalb des Beobachtungszeitraumes keine Dynamik.

Diese Ergebnisse zeigen in humanen Granulozyten erstmalig eine posttraumatische Induktion der IL-10-mRNA. Zudem konnte in Granulozyten eine mRNA-Induktion der am zellulären Signalling der posttraumatischen Entzündungsreaktion beteiligten Proteine nachgewiesen werden. Es kommt zu einer Induktion von STAT3-mRNA und zu einer Depression der mRNA-Expression der Effektorproteine SOCS1 und SOCS3.

Nach einem schweren Polytrauma entwickeln leichter verletzte Patienten in Monozyten und Granulozyten eine signifikant höhere IL-10-mRNA-Expression als schwerer verletzte. Patienten, die im weiteren Verlauf versterben, exprimieren in Monozyten und Granulozyten signifikant mehr SOCS1 und SOCS3-mRNA als Patienten, die überleben (Ausnahme: SOCS1 in Granulozyten).

Diese Pilot-Studie zeigt erstmalig eine Dynamik der untersuchten Mediatoren des STAT-Signaltransduktionswegs in Monozyten und Granulozyten bereits in einer sehr frühen Phase nach Polytrauma. Signifikante Unterschiede bei Überlebenden und Verstorbenen weisen auf eine maßgebliche Beteiligung der untersuchten Mediatoren in der posttraumatischen Entzündungsreaktion hin. Diese Ergebnisse begründen weitere Forschungen innerhalb dieses Signaltransduktionswegs auf Protein- und Zytokinebene, um die Initiation der RNA-Expression bei Polytraumapatienten genauer zu durchleuchten und deren Translation zu untersuchen.

Ein genaues Verständnis dieser Regulation des Zytokin-Signallings und deren Bedeutung in der posttraumatischen Entzündungsreaktion weckt Hoffnung auf neue Ansätze in der zukünftigen Behandlung von Polytraumapatienten. Durch Eingriffe in die zelluläre Regulation der frühen posttraumatischen Entzündungsreaktion könnte das spätere Überleben schwerstverletzter Patienten verbessert werden.

## 6 Zusammenfassung

Nach einem schweren Trauma kommt es zur Destabilisierung des menschlichen Immunsystems, welches im weiteren Verlauf zu einem Multiorganversagen führen kann (6). Dieses stellt die schwerwiegendste Komplikation und die häufigste späte Todesursache nach Trauma dar und ist damit von hoher Relevanz im Handling von Polytraumapatienten (7).

Bei der Entwicklung dieser posttraumatischen Entzündungsreaktion spielen Zytokine und deren Wirkungs- und Regulationsmechanismen eine entscheidende Rolle. Durch den unlängst beschriebenen Regulationsmechanismus der *SOCS/STAT*-Proteine wird das zelluläre Signalling von inflammatorischen Zytokinen vermittelt und gesteuert. Die *Signal Transducer And Activator Of Transkription (STAT)*-Proteine sind die Transkriptionsfaktoren von inflammatorischen Zytokinen. Diese initiieren Gene der Protein-Gruppe der *Supressors Of Cytokine Signalling (SOCS)*. Zudem ist für STAT3 eine autoregulatorische Rolle durch Induktion des eigenen Genes beschrieben. Die SOCS-Proteine wirken als negative Regulatoren des Zytokin-Signallings durch Hemmung der Aktivierung der STAT-Proteine. Im Tierversuch zeigte sich speziell eine Beteiligung von STAT3, SOCS1 und SOCS3 sowie Interleukin-10 bei der posttraumatischen Entzündungsreaktion. Es liegen diesbezüglich jedoch noch keine Erkenntnisse im humanen Mechanismus nach schwerem Polytrauma vor. So war es Ziel dieser Studie, die beteiligten Mediatoren im humanen Mechanismus nach schwerem Polytrauma erstmalig auf mRNA-Ebene zu untersuchen und eine mögliche Dynamik zu festzustellen.

### Teilziel 1:

Lässt sich in Monozyten und Granulozyten gesunder Probanden eine basale mRNA-Expression der STAT/SOCS-Signalkaskade in Zusammenhang mit IL-6 und IL-10 nachweisen und welche Veränderungen ergeben sich nach artifizieller Stimulation mittels

LPS? Gibt es Hinweise auf eine mögliche Etablierung der LPS-Stimulation als Positivkontrolle im JAK/STAT-Signalling?

**Antwort:**

Aus 30ml Vollblut wurden mittels magnetischem cell-sorting (MACS) Monozyten und Granulozyten isoliert und die mRNA mit Hilfe des RNeasy-Kits der Fima Qiagen extrahiert. Die Expressionsmessungen erfolgten durch RT-PCR. Die Proben wurden sowohl nativ verarbeitet als auch nach artifizieller Stimulation mittels bakteriellem LPS. Die dabei ermittelten Ergebnisse sind in **Tab. 28** zusammengefasst:

**Tab. 28:** mRNA-Expression von *IL-10*, *STAT3*, *SOCS1* und *SOCS3* in Monozyten und Granulozyten von Normalprobanden

Expression pro 50ng RNA, Probanden n=5, MW±SEM		
	Nativ	LPS
<b>Monozyten</b>		
<b>IL-10 Monozyten</b>	34 ± 15	77 ± 43
<b>STAT3 Monozyten</b>	5175 ± 1000	3560 ± 885
<b>SOCS1 Monozyten</b>	61 ± 5,0*	3147 ± 203
<b>SOCS3 Monozyten</b>	980 ± 353*	7981 ± 1993
<b>Granulozyten</b>		
<b>IL-10 Granulozyten</b>	7,4 ± 6,2	1,8 ± 1,0
<b>STAT3 Granulozyten</b>	27814 ± 6559	17296 ± 3012
<b>SOCS1 Granulozyten</b>	778 ± 187	399 ± 84
<b>SOCS3 Granulozyten</b>	6660 ± 1624	3510 ± 769

\*=p<0,016 im U-Test nativ vs. LPS-stimuliert

Deutlich zu erkennen sind die signifikanten Änderungen der SOCS1- und SOCS3-mRNA-Expression in Monozyten. In Monozyten kommt es nach LPS-Stimulation zum Anstieg der



IL-10, STAT3, SOCS1 und SOCS3 mRNA, in Granulozyten fällt sie ab. Die Expression von IL-6 ließ sich mit dieser Methode nicht bestimmen, die Kopienzahlen lagen konstant in sehr niedrigen Bereichen. In Monozyten bestätigen die Ergebnisse nach LPS-Stimulation die erwartete Induktion nicht, was eine mögliche Etablierung als Positivkontrolle fraglich erscheinen lässt. Hierfür sind weitere Untersuchungen auf Proteinebene nötig. In der Literatur ist beschrieben, dass es nach LPS-Stimulation von Granulozyten nicht zu einer Aktivierung des JAK/STAT Systems kommt. Die Ursache der in dieser Studie gemessenen Änderung nach LPS-Stimulation bleibt unklar und Bedarf der weiteren Untersuchung auf Proteinebene. Eine Etablierung der LPS-Stimulation von Granulozyten als Positivkontrolle im JAK/STAT-System scheint aufgrund der Literatur nicht möglich.

#### **Teilziel 2:**

Wie verhalten sich die mRNA-Expressionen von IL-10, STAT3, SOCS1 und SOCS3 in Monozyten und Granulozyten polytraumatisierter Patienten in der frühen posttraumatischen Phase?

#### **Antwort:**

Es wurden 20 polytraumatisierte Patienten mit einer Verletzungsschwere von mehr als 16 NISS-Punkten (Mittelwert: 41 Punkte) eingeschlossen. Aus Vollblutproben, die jeweils bei Aufnahme (maximal 90 Minuten nach Trauma) sowie 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Trauma gewonnen wurden, erfolgte die Isolierung von Monozyten und Granulozyten und jeweils die Bestimmung der mRNA-Expression von IL-10, STAT3, SOCS1 und SOCS3. Die Ergebnisse sind in **Tab. 29** dargestellt.

**Tab. 29:** mRNA-Expression von IL-10, STAT3, SOCS1, SOCS3 und der Kontrollen nativ und LPS-stimuliert in Monozyten und Granulozyten polytraumatisierter Patienten bei Aufnahme (A), 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Polytrauma

Expression pro 50 ng RNA, Patienten n= 20, Kontrolle n=5, MW±SEM				
Monozyten	IL-10	STAT3	SOCS1	SOCS3
<b>Ko-</b>	34 ± 15	5175 ± 1000	61 ± 5,0	980 ± 353
<b>LPS</b>	77 ± 43	3560 ± 885	3147 ± 203#	7981 ± 1993#
<b>A</b>	108 ± 38	6338 ± 1765	94,7 ± 20,1	6991 ± 2386*
<b>6h</b>	355 ± 105*	7511 ± 1703	83,7 ± 42,2	1875 ± 567*
<b>12h</b>	298 ± 95*#	5657 ± 1124	81,6 ± 34,5	1442 ± 473
<b>24h</b>	178 ± 51*	6815 ± 1761	62,1 ± 15,0	2607 ± 830*
<b>48h</b>	211 ± 58*	7102 ± 1029	60,1 ± 13,0	2221 ± 623*
<b>72h</b>	217 ± 124*	7965 ± 1549	63,4 ± 18,0	3034 ± 840*
<b>Granulozyten</b>				
<b>Ko-</b>	7,4 ± 6,2	27814 ± 6559	778 ± 187	6660 ± 1624
<b>LPS</b>	1,8 ± 1,0	17296 ± 3012	399 ± 84	3510 ± 769
<b>A</b>	1,88 ± 0,44	15832 ± 2380*	232,5 ± 48,2#	25161 ± 12375
<b>6h</b>	12,0 ± 2,04*	24378 ± 4016	85,8 ± 17,9* #	10722 ± 3009
<b>12h</b>	27,2 ± 10,3* #	18567 ± 2719*	77,5 ± 15,5* #	6755 ± 1911
<b>24h</b>	68,3 ± 28,6* #	18494 ± 2704*	112,6 ± 33,7* #	6021 ± 1571
<b>48h</b>	148 ± 84,3* #	20422 ± 2548*	135,7 ± 40,6* #	8886 ± 2256
<b>72h</b>	129 ± 66,3*	17167 ± 2704*	111,1 ± 19,0* #	11358 ± 4747

\*=p <0,05 SNK-Test, IL-10 A vs.6-72h; STAT3 6h vs. A und 12-72h, SOCS1 A vs. 6-72h; SOCS3 12h vs A, 6h, 24-72h

# =p<0,05 U-Test vs. Ko-

Die wesentlichen Ergebnisse waren hierbei:

- Die IL-10-mRNA-Expression stieg sowohl in Monozyten als auch in Granulozyten signifikant gegenüber dem initialen Wert bei Klinikaufnahme an (siehe Tab. 29 \*). In Monozyten ist die IL-10-Expression 12 Stunden, in Granulozyten 12 bis 72 Stunden nach Trauma signifikant höher als die der gesunden Kontrollgruppe (siehe Tab. 29 #).

- In Granulozyten kommt es 6 Stunden nach Trauma zu einem signifikanten Anstieg der STAT3-Expression gegenüber den anderen Messzeitpunkten (siehe Tab. 29 \*).
- Die SOCS1-mRNA-Expression in Granulozyten sank zu allen Zeitpunkten signifikant gegenüber dem initialen Wert bei Klinikaufnahme ab (siehe Tab. 29 \*). Alle gemessenen Werte waren signifikant niedriger als die der gesunden Kontrollgruppe (siehe Tab. 29 #).
- In Monozyten kommt es 12 Stunden nach Trauma zu einer signifikanten Verminderung der SOCS3-mRNA-Expression im Vergleich zu den übrigen Messzeitpunkten (siehe Tab 29 \*).

Diese Daten weisen erstmalig im humanen Mechanismus eine Stimulierung der mRNA-Expression der am SOCS/STAT-Regulationsmechanismus beteiligten Mediatoren bereits in der frühen Phase nach schwerem Polytrauma nach.

### **Teilziel 3:**

Gibt es gemeinsame klinische Faktoren, die eine Veränderung der mRNA-Expression von STAT3, SOCS1, SOCS3 und IL-10 in Monozyten und Granulozyten polytraumatisierter Patienten bewirken (Verletzungsschwere, Überleben)?

### **Antwort:**

Hierzu wurden die aus Teilziel 2 gewonnenen Daten mit substantiellen Eckpunkten des klinischen Verlaufs verglichen, das heißt die Patienten wurden gruppiert in Abhängigkeit der Merkmale Verletzungsschwere und dem damit verbundenen *New Injury Severity Score NISS*, sowie dem Überleben 90 Tage nach Trauma.

Aus den hieraus gewonnenen Daten lassen sich folgende wesentliche Informationen gewinnen:

### **Verletzungsschwere:**

Die Patienten wurden nach der Verletzungsschwere und dem damit verbundenen NISS-Score in eine Gruppe von weniger und eine Gruppe von mehr als 41 NISS-Punkten eingeteilt. Die Expression von IL-10, STAT3, SOCS1 und SOCS3 in Monozyten und Granulozyten wurde miteinander verglichen.

- Schwerer verletzte Patienten mit einem NISS von mehr als 41 Punkten exprimieren sowohl in Monozyten (siehe Tab. 29) als auch in Granulozyten (siehe Tab. 29) niedrigere IL-10 mRNA-Kopienzahlen als leichter verletzte Patienten mit einem NISS von weniger als 41 Punkten (siehe 4.4.1.2 und 4.4.2.2). Diese Ergebnisse waren bei den Monozyten 12 und 48 Stunden nach Trauma, bei den Granulozyten zum initialen Zeitpunkt, 24, 48 und 72 Stunden nach Trauma signifikant ( $p < 0,048$  im U-Test).
- In Granulozyten war die STAT3-mRNA-Expression der schwerer Verletzten zu allen Messzeitpunkten niedriger als die der leichter verletzten Patienten (siehe 5.5.2.2).

### **Überleben**

Für diese Analyse erfolgte eine Einteilung in eine Gruppe von Patienten, die innerhalb von 90 Tagen starben und eine Gruppe von Patienten, die überlebten.

- Patienten, die verstarben, exprimierten in Monozyten zum initialen Zeitpunkt deutlich und 48 Stunden nach Trauma signifikant mehr SOCS1-mRNA als überlebende Patienten ( $p < 0,033$  im U-Test, siehe 4.6.1.3).
- Die SOCS3-mRNA-Expression der Gruppe der Verstorbenen ist in Monozyten zum initialen Zeitpunkt, maximal 90 Minuten nach Trauma, signifikant höher als die der Überlebenden ( $p = 0,042$  im U-Test, siehe 4.7.1.3). In Granulozyten ist die SOCS3-mRNA-Expression initial etwa gleich, 6 Stunden nach Trauma in der Gruppe der Verstorbenen signifikant und zu den übrigen Messzeitpunkten 12 bis 72 Stunden

deutlich höher als bei den Überlebenden ( $p=0,042$  im U-Test, siehe 4.7.2.3).

- Patienten, die verstarben, zeigten in Granulozyten initial eine niedrigere, zu den übrigen Messzeitpunkten eine höhere STAT3-mRNA-Expression als Patienten, die das Trauma überlebten (siehe 4.5.2.3).

### **Dateninterpretation, Schlussfolgerung und Ausblick:**

Die Daten dieser Arbeit stellen die erstmalige Analyse der mRNA-Expression von IL-10, STAT3, SOCS1 und SOCS3 in Zellen des unspezifischen Immunsystems polytraumatisierter Patienten dar. Sie leisten einen wesentlichen Beitrag zur aktuellen Diskussion über die pathophysiologischen Mechanismen der posttraumatischen Immundefunktionsstörungen durch Untersuchung der in der jüngsten Literatur beschriebenen STAT/SOCS-Feedbackregulierung des Zytokin-Signallings. Die posttraumatische Induktion der IL-10-mRNA sowie die des zugehörigen Transkriptionsfaktors STAT3 und die verminderte Expression der mRNA der Effektorproteine SOCS1 und SOCS3 im Gesamtkollektiv weisen deutlich auf eine posttraumatische Entzündungsreaktion hin. Die niedrigere STAT3-Expression bei schwerer verletzten Patienten mit ebenfalls niedrigerer IL-10-mRNA-Expression zeigt eine überschießende posttraumatische Entzündungsreaktion mit Wirkung des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges. Die vermehrte Expression von SOCS1- und SOCS3-mRNA in Patienten, die verstarben, kann Hinweis auf eine posttraumatische Dysregulation des Immunsystems mit vermehrter Aktivierung der Feedbackhemmung des Signallings inflammatorischer Zytokine geben. Um die biologische Relevanz dieser Ergebnisse zu überprüfen und eine mögliche Schlüsselrolle in der posttraumatischen Entzündungsregulation nachzuweisen, sind weitere Forschungen auf Proteinebene an einem größeren Patientenkollektiv nötig.

## 7 Literaturverzeichnis

- 1 Vorndran I. Unfallentwicklung auf deutschen Strassen 2010. Wirtschaft und Statistik, Statistisches Bundesamt 2011; (6/2011).
- 2 Stewart RM, Myers JG, Dent DL, Ermis P, Gray GA, Villarreal R, et al. Seven hundred fifty-three consecutive deaths in a level I trauma center: the argument for injury prevention. J Trauma 2003; 54 (1): 66-70.
- 3 Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie (DGU). Leitlinien Polytrauma. 2004.
- 4 Sauaia A, Moore FA, Moore EE, Moser KS, Brennan R, Read RA, et al. Epidemiology of trauma deaths: a reassessment. J Trauma 1995; 38 (2): 185-93.
- 5 Acosta JA, Yang JC, Winchell RJ, Simons RK, Fortlage DA, Hollingsworth-Fridlund P, et al. Lethal injuries and time to death in a level I trauma center. J Am Coll Surg 1998; 186 (5): 528-33.
- 6 Hietbrink F, Koenderman L, Rijkers G, Leenen L. Trauma: the role of the innate immune system. World J Emerg Surg 2006; 1 : 15.
- 7 Nast-Kolb D, Aufmkolk M, Rucholtz S, Obertacke U, Waydhas C. Multiple organ failure still a major cause of morbidity but not mortality in blunt multiple trauma. J Trauma 2001; 51 (5): 835-41.
- 8 Reinhart K, Brunkhorst KM. Diagnose und Therapie der Sepsis S-2 Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI)\*. Deutsche Sepsis-Gesellschaft e V 2005.
- 9 Hoover L, Bochicchio GV, Napolitano LM, Joshi M, Bochicchio K, Meyer W, et al. Systemic inflammatory response syndrome and nosocomial infection in trauma. J Trauma 2006; 61 (2): 310-6.
- 10 Baue AE, Durham R, Faist E. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS), multiple organ dysfunction syndrome (MODS), multiple organ failure (MOF): are we winning the battle? Shock 1998; 10 (2): 79-89.
- 11 Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. N Engl J Med

2003; 348 (2): 138-50.

- 12 Power C, Fanning N, Redmond HP. Cellular apoptosis and organ injury in sepsis: a review. *Shock* 2002; 18 (3): 197-211.
- 13 Rensing H, Bauer M. [Multiple organ failure. Mechanisms, clinical manifestations and treatment strategies]. *Anaesthesist* 2001; 50 (11): 819-41.
- 14 Cavaillon JM, dib-Conquy M. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care* 2006; 10 (5): 233.
- 15 West MA, Heagy W. Endotoxin tolerance: a review. *Crit Care Med* 2002; 30 (1 Suppl): S64-S73.
- 16 Mannick JA, Rodrick ML, Lederer JA. The immunologic response to injury. *J Am Coll Surg* 2001; 193 (3): 237-44.
- 17 Keel M, Trentz O. Pathophysiology of polytrauma. *Injury* 2005; 36 (6): 691-709.
- 18 Rotstein OD. Modeling the two-hit hypothesis for evaluating strategies to prevent organ injury after shock/resuscitation. *J Trauma* 2003; 54 (5 Suppl): S203-S206.
- 19 Schroder O, Laun RA, Held B, Ekkernkamp A, Schulte KM. Association of interleukin-10 promoter polymorphism with the incidence of multiple organ dysfunction following major trauma: results of a prospective pilot study. *Shock* 2004; 21 (4): 306-10.
- 20 Roumen RM, Hendriks T, van d, V, Nieuwenhuijzen GA, Sauerwein RW, van der Meer JW, et al. Cytokine patterns in patients after major vascular surgery, hemorrhagic shock, and severe blunt trauma. Relation with subsequent adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure. *Ann Surg* 1993; 218 (6): 769-76.
- 21 Oberholzer A, Keel M, Zellweger R, Steckholzer U, Trentz O, Ertel W. Incidence of septic complications and multiple organ failure in severely injured patients is sex specific. *J Trauma* 2000; 48 (5): 932-7.
- 22 Hensler T, Sauerland S, Bouillon B, Raum M, Rixen D, Helling HJ, et al. Association between injury pattern of patients with multiple injuries and circulating levels of soluble tumor necrosis factor receptors, interleukin-6 and interleukin-10, and polymorphonuclear neutrophil elastase. *J Trauma* 2002; 52 (5): 962-70.

- 23 Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000; 118 (2): 503-8.
- 24 Hensler T, Heinemann B, Sauerland S, Lefering R, Bouillon B, Andermahr J, et al. Immunologic alterations associated with high blood transfusion volume after multiple injury: effects on plasmatic cytokine and cytokine receptor concentrations. *Shock* 2003; 20 (6): 497-502.
- 25 Bhatia R, Dent C, Topley N, Pallister I. Neutrophil priming for elastase release in adult blunt trauma patients. *J Trauma* 2006; 60 (3): 590-6.
- 26 Botha AJ, Moore FA, Moore EE, Kim FJ, Banerjee A, Peterson VM. Postinjury neutrophil priming and activation: an early vulnerable window. *Surgery* 1995; 118 (2): 358-64.
- 27 Botha AJ, Moore FA, Moore EE, Fontes B, Banerjee A, Peterson VM. Postinjury neutrophil priming and activation states: therapeutic challenges. *Shock* 1995; 3 (3): 157-66.
- 28 DiPietro LA. Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. *Shock* 1995; 4 (4): 233-40.
- 29 Muller Kobold AC, Tulleken JE, Zijlstra JG, Sluiter W, Hermans J, Kallenberg CG, et al. Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality. *Intensive Care Med* 2000; 26 (7): 883-92.
- 30 Giannoudis PV. Current concepts of the inflammatory response after major trauma: an update. *Injury* 2003; 34 (6): 397-404.
- 31 Ni CN, Redmond HP. The immunological consequences of injury. *Surgeon* 2006; 4 (1): 23-31.
- 32 Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Peterson VM. Interleukin-6 in the injured patient. Marker of injury or mediator of inflammation? *Ann Surg* 1996; 224 (5): 647-64.
- 33 Calandra T, Gerain J, Heumann D, Baumgartner JD, Glauser MP. High circulating levels of interleukin-6 in patients with septic shock: evolution during sepsis, prognostic value, and interplay with other cytokines. The Swiss-Dutch J5 Immunoglobulin Study Group. *Am J Med* 1991; 91 (1): 23-9.
- 34 Gosain A, Gamelli RL. A primer in cytokines. *J Burn Care Rehabil* 2005; 26 (1): 7-12.



- 35 Gebhard F, Pfetsch H, Steinbach G, Strecker W, Kinzl L, Bruckner UB. Is interleukin 6 an early marker of injury severity following major trauma in humans? Arch Surg 2000; 135 (3): 291-5.
- 36 Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, et al. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. Nature 1986; 324 (6092): 73-6.
- 37 Lotz M, Jirik F, Kabouridis P, Tsoukas C, Hirano T, Kishimoto T, et al. B cell stimulating factor 2/interleukin 6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes. J Exp Med 1988; 167 (3): 1253-8.
- 38 Gauldie J, Richards C, Harnish D, Lansdorp P, Baumann H. Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1987; 84 (20): 7251-5.
- 39 Castell JV, Gomez-Lechon MJ, David M, Andus T, Geiger T, Trullenque R, et al. Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. FEBS Lett 1989; 242 (2): 237-9.
- 40 Botha AJ, Moore FA, Moore EE, Sauaia A, Banerjee A, Peterson VM. Early neutrophil sequestration after injury: a pathogenic mechanism for multiple organ failure. J Trauma 1995; 39 (3): 411-7.
- 41 Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Barnett CC, Jr., Carl VS, Peterson VN. Interleukin-6 delays neutrophil apoptosis. Arch Surg 1996; 131 (1): 24-9.
- 42 Lenz A, Franklin GA, Cheadle WG. Systemic inflammation after trauma. Injury 2007; 38 (12): 1336-45.
- 43 Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. Chest 2000; 117 (4): 1162-72.
- 44 Bhatia M, Moochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. J Pathol 2004; 202 (2): 145-56.
- 45 Tamassia N, Calzetti F, Menestrina N, Rossato M, Bazzoni F, Götting L, et al. Circulating neutrophils of septic patients constitutively express IL-10R1 and are promptly responsive to IL-10. Int Immunol 2008; 20 (4): 535-41.

- 46 Yeh FL, Lin WL, Shen HD. Changes in circulating levels of an anti-inflammatory cytokine interleukin 10 in burned patients. *Burns* 2000; 26 (5): 454-9.
- 47 Sherry RM, Cue JI, Goddard JK, Parramore JB, DiPiro JT. Interleukin-10 is associated with the development of sepsis in trauma patients. *J Trauma* 1996; 40 (4): 613-6.
- 48 Pezzilli R, Billi P, Miniero R, Barakat B. Serum interleukin-10 in human acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1997; 42 (7): 1469-72.
- 49 Marchant A, Deviere J, Byl B, De GD, Vincent JL, Goldman M. Interleukin-10 production during septicemia. *Lancet* 1994; 343 (8899): 707-8.
- 50 Lyons A, Kelly JL, Rodrick ML, Mannick JA, Lederer JA. Major injury induces increased production of interleukin-10 by cells of the immune system with a negative impact on resistance to infection. *Ann Surg* 1997; 226 (4): 450-8.
- 51 Parsons PE, Moss M, Vannice JL, Moore EE, Moore FA, Repine JE. Circulating IL-1ra and IL-10 levels are increased but do not predict the development of acute respiratory distress syndrome in at-risk patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155 (4): 1469-73.
- 52 Neidhardt R, Keel M, Steckholzer U, Safret A, Ungethuen U, Trentz O, et al. Relationship of interleukin-10 plasma levels to severity of injury and clinical outcome in injured patients. *J Trauma* 1997; 42 (5): 863-70.
- 53 Bown MJ, Horsburgh T, Nicholson ML, Bell PR, Sayers RD. Cytokines, their genetic polymorphisms, and outcome after abdominal aortic aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004; 28 (3): 274-80.
- 54 Ivashkiv LB, Hu X. Signaling by STATs. *Arthritis Res Ther* 2004; 6 (4): 159-68.
- 55 Darnell JE, Jr., Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994; 264 (5164): 1415-21.
- 56 Ihle JN. STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* 1996; 84 (3): 331-4.
- 57 Schindler C. Cytokines and JAK-STAT signaling. *Exp Cell Res* 1999; 253 (1): 7-14.

- 58 Alexander WS. Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002; 2 (6): 410-6.
- 59 Krebs DL, Hilton DJ. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells* 2001; 19 (5): 378-87.
- 60 Larsen L, Ropke C. Suppressors of cytokine signalling: SOCS. *APMIS* 2002; 110 (12): 833-44.
- 61 Darnell JE, Jr. STATs and gene regulation. *Science* 1997; 277 (5332): 1630-5.
- 62 Levy DE, Darnell JE, Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3 (9): 651-62.
- 63 Ahmed ST, Ivashkiv LB. Inhibition of IL-6 and IL-10 signaling and Stat activation by inflammatory and stress pathways. *J Immunol* 2000; 165 (9): 5227-37.
- 64 O'Sullivan LA. Cytokine receptor signaling through the Jak-Stat-Socs pathway in disease. 2007.
- 65 Ohtani T, Ishihara K, Atsumi T, Nishida K, Kaneko Y, Miyata T, et al. Dissection of signaling cascades through gp130 in vivo: reciprocal roles for S. *Immunity* 2000; 12 (1): 95-105.
- 66 Takeda K, Kaisho T, Yoshida N, Takeda J, Kishimoto T, Akira S. Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice. *J Immunol* 1998; 161 (9): 4652-60.
- 67 Takeda K, Clausen BE, Kaisho T, Tsujimura T, Terada N, Forster I, et al. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* 1999; 10 (1): 39-49.
- 68 Welte T, Zhang SS, Wang T, Zhang Z, Hesslein DG, Yin Z, et al. STAT3 deletion during hematopoiesis causes Crohn's disease-like pathogenesis and lethality: a critical role of STAT3 in innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100 (4): 1879-84.
- 69 Benkhart EM, Siedlar M, Wedel A, Werner T, Ziegler-Heitbrock HW. Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression. *J Immunol* 2000; 165 (3): 1612-7.

- 70 Moran A, Thacker SA, Arian AA, Mastrangelo MA, Wu Y, Yu B, et al. IL-6-mediated activation of Stat3alpha prevents trauma/hemorrhagic shock-induced liver inflammation. *PLoS One* 2011; 6 (6): e21449.
- 71 Niemand C, Nimmesgern A, Haan S, Fischer P, Schaper F, Rossaint R, et al. Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in primary human macrophages is differentially modulated by suppressor of cytokine signaling 3. *J Immunol* 2003; 170 (6): 3263-72.
- 72 Hanada T, Yoshimura A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13 (4-5): 413-21.
- 73 Pfitzner E, Kliem S, Baus D, Litterst CM. The role of STATs in inflammation and inflammatory diseases. *Curr Pharm Des* 2004; 10 (23): 2839-50.
- 74 Alexander WS, Hilton DJ. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol* 2004; 22 : 503-29.
- 75 Rakesh K, Agrawal DK. Controlling cytokine signaling by constitutive inhibitors. *Biochem Pharmacol* 2005; 70 (5): 649-57.
- 76 Dalpke AH, Oppen S, Zimmermann S, Heeg K. Suppressors of cytokine signaling (SOCS)-1 and SOCS-3 are induced by CpG-DNA and modulate cytokine responses in APCs. *J Immunol* 2001; 166 (12): 7082-9.
- 77 Kawazoe Y, Naka T, Fujimoto M, Kohzaki H, Morita Y, Narazaki M, et al. Signal transducer and activator of transcription (STAT)-induced STAT inhibitor 1 (SSI-1)/suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) inhibits insulin signal transduction pathway through modulating insulin receptor substrate 1 (IRS-1) phosphorylation. *J Exp Med* 2001; 193 (2): 263-9.
- 78 Hanada T, Yoshida H, Kato S, Tanaka K, Masutani K, Tsukada J, et al. Suppressor of cytokine signaling-1 is essential for suppressing dendritic cell activation and systemic autoimmunity. *Immunity* 2003; 19 (3): 437-50.
- 79 Naka T, Matsumoto T, Narazaki M, Fujimoto M, Morita Y, Ohsawa Y, et al. Accelerated apoptosis of lymphocytes by augmented induction of Bax in SSI-1 (STAT-induced STAT inhibitor-1) deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95 (26): 15577-82.
- 80 Starr R, Metcalf D, Elefanty AG, Brysha M, Willson TA, Nicola NA, et al. Liver

degeneration and lymphoid deficiencies in mice lacking suppressor of cytokine signaling-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95 (24): 14395-9.

- 81 Metcalf D, Mifsud S, Di RL, Nicola NA, Hilton DJ, Alexander WS. Polycystic kidneys and chronic inflammatory lesions are the delayed consequences of loss of the suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99 (2): 943-8.
- 82 Baker BJ, Akhtar LN, Benveniste EN. SOCS1 and SOCS3 in the control of CNS immunity. *Trends Immunol* 2009; 30 (8): 392-400.
- 83 Greenhalgh CJ, Hilton DJ. Negative regulation of cytokine signaling. *J Leukoc Biol* 2001; 70 (3): 348-56.
- 84 Croker BA, Krebs DL, Zhang JG, Wormald S, Willson TA, Stanley EG, et al. SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo. *Nat Immunol* 2003; 4 (6): 540-5.
- 85 Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003; 374 (Pt 1): 1-20.
- 86 Whyte CS, Bishop ET, Ruckerl D, Gaspar-Pereira S, Barker RN, Allen JE, et al. Suppressor of cytokine signaling (SOCS)1 is a key determinant of differential macrophage activation and function. *J Leukoc Biol* 2011; 90 (5): 845-54.
- 87 Ding Y, Chen D, Tarcsafalvi A, Su R, Qin L, Bromberg JS. Suppressor of cytokine signaling 1 inhibits IL-10-mediated immune responses. *J Immunol* 2003; 170 (3): 1383-91.
- 88 Lang R, Pauleau AL, Parganas E, Takahashi Y, Mages J, Ihle JN, et al. SOCS3 regulates the plasticity of gp130 signaling. *Nat Immunol* 2003; 4 (6): 546-50.
- 89 Lee CK, Raz R, Gimeno R, Gertner R, Wistinghausen B, Takeshita K, et al. STAT3 is a negative regulator of granulopoiesis but is not required for G-CSF-dependent differentiation. *Immunity* 2002; 17 (1): 63-72.
- 90 Tamiya T, Kashiwagi I, Takahashi R, Yasukawa H, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins and JAK/STAT pathways: regulation of T-cell inflammation by SOCS1 and SOCS3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31 (5): 980-5.

- 91 Berlato C, Cassatella MA, Kinjyo I, Gatto L, Yoshimura A, Bazzoni F. Involvement of suppressor of cytokine signaling-3 as a mediator of the inhibitory effects of IL-10 on lipopolysaccharide-induced macrophage activation. *J Immunol* 2002; 168 (12): 6404-11.
- 92 Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 2001; 13 (2): 85-94.
- 93 Severgnini M, Takahashi S, Rozo LM, Homer RJ, Kuhn C, Jhung JW, et al. Activation of the STAT pathway in acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 286 (6): L1282-L1292.
- 94 Balogh Z, Offner PJ, Moore EE, Biffl WL. NISS predicts postinjury multiple organ failure better than the ISS. *J Trauma* 2000; 48 (4): 624-7.
- 95 Brenneman FD, Boulanger BR, McLellan BA, Redelmeier DA. Measuring injury severity: time for a change? *J Trauma* 1998; 44 (4): 580-2.
- 96 Osler T, Baker SP, Long W. A modification of the injury severity score that both improves accuracy and simplifies scoring. *J Trauma* 1997; 43 (6): 922-5.
- 97 Association for the Advancement of Automotive Medicine. The Abbreviated Injury Scale -1990 revision-Update 1998. 1998.
- 98 Bone RC. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann Intern Med* 1996; 125 (8): 680-7.
- 99 Faist E, Schinkel C, Zimmer S. Update on the mechanisms of immune suppression of injury and immune modulation. *World J Surg* 1996; 20 (4): 454-9.
- 100 Schweiberer L, Nast-Kolb D, Duswald KH, Waydhas C, Muller K. [Polytrauma--treatment by the staged diagnostic and therapeutic plan]. *Unfallchirurg* 1987; 90 (12): 529-38.
- 101 Mutschler W, Marzi I. [Management of polytrauma]. *Zentralbl Chir* 1996; 121 (11): 895.
- 102 Kanz KG, Eitel F, Waldner H, Schweiberer L. [Development of clinical algorithms for quality assurance in management of multiple trauma]. *Unfallchirurg* 1994; 97 (6):

303-7.

- 103 Biberthaler P, Stegmaier J, Mayer V, Kirchhoff C, Neth P, Mussack T, et al. Initial posttraumatic translocation of NF-kappaB and TNF-alpha mRNA expression in peripheral blood monocytes of trauma patients with multiple injuries: a pilot study. *Shock* 2004; 22 (6): 527-32.
- 104 Biberthaler P, Bogner V, Baker HV, Lopez MC, Neth P, Kanz KG, et al. Genome-wide monocytic mRNA expression in polytrauma patients for identification of clinical outcome. *Shock* 2005; 24 (1): 11-9.
- 105 Bardenheuer M, Obertacke U, Waydhas C, Nast-Kolb D. [Epidemiology of the severely injured patient. A prospective assessment of preclinical and clinical management. AG Polytrauma of DGU]. *Unfallchirurg* 2000; 103 (5): 355-63.
- 106 Ruchholtz S, Nast-Kolb D, Waydhas C, Lefering R. [The trauma register of the 'Polytrauma' Committee of the German Society of Trauma Surgery as the basis for quality management in the management of severely injured patients]. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 1997; 114 : 1265-7.
- 107 Oestern HJ, Kabus K. [Comparison of various trauma score systems. An overview]. *Unfallchirurg* 1994; 97 (4): 177-84.
- 108 Ertel W, Keel M, Marty D, Hoop R, Safret A, Stocker R, et al. [Significance of systemic inflammation in 1,278 trauma patients]. *Unfallchirurg* 1998; 101 (7): 520-6.
- 109 Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 1990; 11 (2): 231-8.
- 110 Schinkel C, Licht K, Zedler S, Schinkel S, Fraunberger P, Fuchs D, et al. Interferon-gamma modifies cytokine release in vitro by monocytes from surgical patients. *J Trauma* 2001; 50 (2): 321-7.
- 111 McDonald PP, Bald A, Cassatella MA. Activation of the NF-kappaB pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils. *Blood* 1997; 89 (9): 3421-33.
- 112 Zahler S, Kowalski C, Brosig A, Kupatt C, Becker BF, Gerlach E. The function of neutrophils isolated by a magnetic antibody cell separation technique is not altered in comparison to a density gradient centrifugation method. *J Immunol Methods* 1997; 200 (1-2): 173-9.

- 113 Cotter MJ, Norman KE, Hellewell PG, Ridger VC. A novel method for isolation of neutrophils from murine blood using negative immunomagnetic separation. *Am J Pathol* 2001; 159 (2): 473-81.
- 114 Barrio E, Calvo MT, Miramar MD, Lorente F, Rodriguez A, Labarta JI, et al. Study of apoptosis and related proteins, CRH and hpGH in placentas of newborns small for gestational age (SGA). *Pediatr Endocrinol Rev* 2009; 6 Suppl 3 : 337-42.
- 115 McKenna LA, Gehrsitz A, Soder S, Eger W, Kirchner T, Aigner T. Effective isolation of high-quality total RNA from human adult articular cartilage. *Anal Biochem* 2000; 286 (1): 80-5.
- 116 Malorny B, Made D, Teufel P, Berghof-Jager C, Huber I, Anderson A, et al. Multicenter validation study of two blockcycler- and one capillary-based real-time PCR methods for the detection of Salmonella in milk powder. *Int J Food Microbiol* 2007; 117 (2): 211-8.
- 117 Lindsay TF, Hill J, Ortiz F, Rudolph A, Valeri CR, Hechtman HB, et al. Blockade of complement activation prevents local and pulmonary albumin leak after lower torso ischemia-reperfusion. *Ann Surg* 1992; 216 (6): 677-83.
- 118 Hill J, Lindsay TF, Ortiz F, Yeh CG, Hechtman HB, Moore FD, Jr. Soluble complement receptor type 1 ameliorates the local and remote organ injury after intestinal ischemia-reperfusion in the rat. *J Immunol* 1992; 149 (5): 1723-8.
- 119 Fosse E, Pillgram-Larsen J, Svennevig JL, Nordby C, Skulberg A, Mollnes TE, et al. Complement activation in injured patients occurs immediately and is dependent on the severity of the trauma. *Injury* 1998; 29 (7): 509-14.
- 120 Kobayashi Y. The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci* 2008; 13 : 2400-7.
- 121 West MA, Baker J, Bellingham J, Clair L. Discordant reprogramming of LPS-stimulated cytokine gene transcription and secretion by macrophages after LPS pretreatment. *J Surg Res* 1996; 63 (1): 209-14.
- 122 Kobayashi SD, Voyich JM, Whitney AR, DeLeo FR. Spontaneous neutrophil apoptosis and regulation of cell survival by granulocyte macrophage-colony stimulating factor. *J Leukoc Biol* 2005; 78 (6): 1408-18.
- 123 Selzman CH, Shames BD, Miller SA, Pulido EJ, Meng X, McIntyre RC, Jr., et al.



Therapeutic implications of interleukin-10 in surgical disease. *Shock* 1998; 10 (5): 309-18.

- 124 Delong WG, Jr., Born CT. Cytokines in patients with polytrauma. *Clin Orthop Relat Res* 2004; (422): 57-65.
- 125 Moore FA, Sauaia A, Moore EE, Haenel JB, Burch JM, Lezotte DC. Postinjury multiple organ failure: a bimodal phenomenon. *J Trauma* 1996; 40 (4): 501-10.
- 126 Marchant A, Bruyns C, Vandenabeele P, Ducarme M, Gerard C, Delvaux A, et al. Interleukin-10 controls interferon-gamma and tumor necrosis factor production during experimental endotoxemia. *Eur J Immunol* 1994; 24 (5): 1167-71.
- 127 Donnelly RP, Dickensheets H, Finbloom DS. The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19 (6): 563-73.
- 128 Levy DE, Lee CK. What does Stat3 do? *J Clin Invest* 2002; 109 (9): 1143-8.
- 129 Akira S, Nishio Y, Inoue M, Wang XJ, Wei S, Matsusaka T, et al. Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell* 1994; 77 (1): 63-71.
- 130 Alonzi T, Fattori E, Cappelletti M, Ciliberto G, Poli V. Impaired Stat3 activation following localized inflammatory stimulus in IL-6-deficient mice. *Cytokine* 1998; 10 (1): 13-8.
- 131 Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, et al. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 1997; 387 (6636): 917-21.
- 132 Shen X, Hong F, Nguyen VA, Gao B. IL-10 attenuates IFN-alpha-activated STAT1 in the liver: involvement of SOCS2 and SOCS3. *FEBS Lett* 2000; 480 (2-3): 132-6.
- 133 Stoiber D, Kovarik P, Cohnen S, Johnston JA, Steinlein P, Decker T. Lipopolysaccharide induces in macrophages the synthesis of the suppressor of cytokine signaling 3 and suppresses signal transduction in response to the activating factor IFN-gamma. *J Immunol* 1999; 163 (5): 2640-7.

- 134 Ichiba M, Nakajima K, Yamanaka Y, Kiuchi N, Hirano T. Autoregulation of the Stat3 gene through cooperation with a cAMP-responsive element-binding protein. *J Biol Chem* 1998; 273 (11): 6132-8.
- 135 Qin H, Roberts KL, Niyongere SA, Cong Y, Elson CO, Benveniste EN. Molecular mechanism of lipopolysaccharide-induced SOCS-3 gene expression in macrophages and microglia. *J Immunol* 2007; 179 (9): 5966-76.
- 136 Carl VS, Gautam JK, Comeau LD, Smith MF, Jr. Role of endogenous IL-10 in LPS-induced STAT3 activation and IL-1 receptor antagonist gene expression. *J Leukoc Biol* 2004; 76 (3): 735-42.
- 137 Nakagawa R, Naka T, Tsutsui H, Fujimoto M, Kimura A, Abe T, et al. SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. *Immunity* 2002; 17 (5): 677-87.
- 138 Iyer SS, Ghaffari AA, Cheng G. Lipopolysaccharide-mediated IL-10 transcriptional regulation requires sequential induction of type I IFNs and IL-27 in macrophages. *J Immunol* 2010; 185 (11): 6599-607.
- 139 Malcolm KC, Worthen GS. Lipopolysaccharide stimulates p38-dependent induction of antiviral genes in neutrophils independently of paracrine factors. *J Biol Chem* 2003; 278 (18): 15693-701.
- 140 Brochner AC, Toft P. Pathophysiology of the systemic inflammatory response after major accidental trauma. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* 2009; 17 : 43.
- 141 Vester H. Analyse der nukleären Translokation und DNA-Bindungsaktivität von STAT1 und STAT3 in polytraumatisierten Patienten in der frühen posttraumatischen Phase. Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät. 2009.
- 142 Mayer V. Analyse intrazellulärer mRNA-expression in Monozyten und PMN-Granulozyten polytraumatisierter Patienten mittels real-time PCR. Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät. 2008.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIS	Abbreviated Injury Scale (AIS)
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
cDNA	complementary Desoxyribonukleinsäure
CARS	Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome
CIS	Cytokine-Induced SRC-homology 2 Protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin- 6
ISS	Injury Severity Score
IL-10	Interleukin-10
JAK	Januskinase
STAT	Signal Transducer and Activator of Transkription
JAB	Januskinase-Binding Protein
LPS	Lipopolysaccharide
MACS	Magnetic Cell Sorting
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MARS	Mixed Antiinflammatory Response Syndrom
MODS	Multiple Organ Dysfunction Syndrome
MOF	Multiple Organ Failure
MW	Mittelwert
SEM	Standard Fehler des Mittelwertes

NISS	New Injury Severity Score
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Real-Time-PCR-Polymerase-Kettenreaktion
SSI	STAT-Induced STAT Inhibitor
SOCS	Supressor Of Cytokine Signalling
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
Tab.	Tabelle
TNF	Tumor-Necrose-Faktor

## 9 Danksagung

Mein ausdrücklicher Dank gilt meinem Doktorvater und damaligem Leiter der Notaufnahme der Chirurgischen Klinik und Poliklinik-Innenstadt, Herrn Prof. Dr. med. Karl-Georg Kanz, für die Annahme des Themas und die uneingeschränkte wissenschaftliche Unterstützung.

Insbesondere möchte ich mich bei Frau Dr. med. Viktoria Bogner für ihre Hilfsbereitschaft, und ihr überaus großes Engagement bedanken. Frau Dr. med. Julia Stegmaier danke ich für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. Peter Biberthaler bedanken, der mir diese Studie anvertraut hat. Er gab mir stets das sichere Gefühl, zu einem Abschluss zu kommen und hatte immer ein offenes Ohr für meine Probleme.

Herzlichen Dank gilt OÄ Dr. med. Th. Hummel, dem Pflegepersonal und den Ärzten der chirurgischen Notaufnahme, sowie der chirurgischen Intensivstation für die beständige Unterstützung und die freundliche Zusammenarbeit.

Weiterhin möchte ich mich noch bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe *Trauma and Resuscitation*, Frau Maren Jenike und Frau Dr. med. Helen Vester für die gute Zusammenarbeit und gegenseitige Unterstützung bedanken. Entscheidend für die erfolgreiche Durchführung dieses Projekts waren die große Zuverlässigkeit, Flexibilität und Teamfähigkeit jedes Einzelnen.

Mein abschließender Dank gilt meinen Eltern und meiner Frau Judith sowie meinen Söhnen, für ihre immerwährende Unterstützung, ihr Verständnis und ihre stetige Motivation.

## PUBLIKATIONEN DER ARBEIT

02/2014      Brumann M, Matz M, Kusmenkov T, Stegmaier J, Biberthaler P, Kanz KG, Mutschler W, Bogner V, Impact of STAT/SOCS mRNA expression levels after major injury. Mediators Inflamm 2014; 2014: 749175.

## **Eidesstattliche Versicherung**

**Matz, Michael**

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Dynamik des SOCS/STAT-Regulationsmechanismus in der frühen Phase nach schwerem Polytrauma.

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand